

Untersuchungen zur Struktur und zum Ausdruck Mitochondrieller DNA in Hefe

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades**

vorgelegt von

Jürgen Naggert

aus Fürth/Bay.

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN
ZUR STRUKTUR UND ZUM AUSDRUCK
MITOCHONDRIELLER DNA
IN HEFE

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Jürgen Naggert
aus Fürth/Bay.

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg .

Tag der mündlichen Prüfung : 30.09.1983

Vorsitzender der

Promotionskommission :	Professor Dr. K. Jacobs
Erstberichterstatte r :	Professor Dr. E. Schweizer
Zweitberichterstatte r :	Professor Dr. H. Kersten

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1980 bis August 1983 auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Schweizer am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt .

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt .

Herrn Professor Dr. E. Schweizer möchte ich für seine Anleitung und die Unterstützung , die er mir und meiner Arbeit jederzeit gewährte , herzlich danken .

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg bedanke ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit .

Ein besonderer Dank gilt Frl. E. Rehm für ihre geduldige Hilfe bei der Niederschrift dieser Arbeit .

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Verzeichnis der Figuren und Tabellen	10
Benutzte Abkürzungen	15
I. Einleitung	17
II. Material und Methoden	25
1. Geräte	25
2. Chemikalien	26
3. Enzyme	27
4. Hefestämme	27
5. Bakterienstämme	27
6. Medien	28
7. Plasmide	28
8. Proteinbestimmung	28
9. Nukleinsäurebestimmungen	29
10. Herstellung stabiler Präparationen submitochondrieller Partikel	29
11. Enzymtests	29
12. Bestimmung der Atmungsraten von Hefe- zellkulturen mit Hilfe einer Sauer- stoffelektrode	29
13. Bestimmung des Anteils an Revertanten und ρ^- -Mutanten in Hefezellkulturen	29
14. Isolierung von Cytochromoxidase	30

15. Isolierung von Komplex III aus Bäckerhefe	30
16. Isolierung von oligomycinempfindlich- er ATPase aus Bäckerhefe	30
17. SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese	31
18. Gewinnung von Antikörpern	32
19. "Western-blot" Hybridisierung	32
20. Isolierung von Mitochondrien zur Gewinnung von mtDNA und mtrRNA aus Hefe	32
21. Isolierung von mtDNA aus intakten Hefemitochondrien	33
22. Isolierung von mtrRNA aus intakten Hefemitochondrien	34
23. Schnelle Isolierung von Plasmid- und Mitochondrien-DNA aus kleinen Hefe- mengen	35
24. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	35
a) "Miniscreen"-Methode zur Isolie- rung von Plasmid-DNA aus Bakte- rien	36
b) Isolierung von Plasmid-DNA aus 11-Kulturen von <u>E.coli</u>	36
25. Restriktionsspaltung von mt- und Plasmid-DNA	37
26. Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Proben	37
27. Größenbestimmung von Restriktionsfrag- menten	38
28. "Southern-blot" Hybridisierung	41
29. Präparative Isolierung von mtDNA- Restriktionsfragmenten	43

30. "Nick-translation" von DNA-Fragmenten und Plasmiden	43
31. Entfernung der 5'-PO ₄ -Gruppen von DNA-Fragmenten	43
32. Ligieren von DNA-Restriktionsfragmenten	44
33. Transformation von E.coli K12 Stämmen	44
34. Harnstoff/Agarose-Gelelektrophorese von mtRNA	44
35. Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophorese von mtRNA	45
36. "Northern-blot" Hybridisierung	45
III. Ergebnisse	47
A. Enzymologische Untersuchungen an pet-ts Mutanten zum Nachweis genspezifischer funktioneller Defekte	47
1. Einfluß von Hemmstoffen der mitochon- driellen Atmungskette auf Wachstum und Enzymaktivitäten in Wildtyp-Zellen und in Protease A- bzw. B-defekten Mutanten	47
2. Abhängigkeit der Aktivität mitochon- drieller Enzyme in Wildtyp-Mitochondrien von der Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	55
3. Inaktivierungskinetiken einiger ausge- suchter pet-ts Mutanten	62
4. Suche nach spezifischen Enzymdefekten bei pet-ts Mutanten aus 180 verschiedenen Komplementationsgruppen	66
5. Reinigung der Enzymkomplexe bc ₁ , ATPase und Cytochromoxidase aus Hefemitochon- drien. Isolierung der Kern-kodierten	

Untereinheiten aus gereinigter Cytochromoxidase .	87
6. Anwendung der "Western-blot"-Technik zum Nachweis von Cytochromoxidase-Untereinheiten in atmungsdefekten pet-ts Mutanten mit Hilfe von Antikörpern gegen das native Gesamtzym .	91
B. Restriktionskartierung der mitochondriellen DNA des <u>Saccharomyces cerevisiae</u> Stammes SC 167 .	96
1. Vorversuche zur Isolierung mitochondrieller DNA aus Hefe .	97
2. Spaltmuster und Anzahl der Restriktionsfragmente der SC 167 mtDNA .	101
3. Größenbestimmung der Restriktionsfragmente .	111
4. "Southern"-Hybridisierung restriktionsgespaltener SC 167 mtDNA mit definierten SC 167 und KL14-4A mtDNA-Fragmenten .	120
5. Vergleich der mitochondriellen DNA's der Hefestämme SC 167 und KL14-4A .	152
6. Klonierung von mtDNA Restriktionsfragmenten der Stämme KL14-4A und SC 167 .	157
C. Analyse von Transkriptionsprodukten in pet-ts Mutanten .	169
1. Vorversuche zur Isolierung und gelelektrophoretischen Charakterisierung von mRNA .	171
2. Untersuchung der Transkription des OXI 3	

Bereiches und der Reifung von OXI 3- Transkripten .	178
3. mtDNA Transkription in pet-ts Mutanten mit vollständig oder partiell defekter mitochondrieller Proteinsynthese .	190
IV. Diskussion	205
V. Zusammenfassung	215
VI. Literaturverzeichnis	217

Verzeichnis der Figuren und Tabellen

Fig. 1	Schematische Darstellung der Herkunft und Lokalisation einiger Komponenten der inneren Mitochondrienmembran .	17
Fig. 2	Vergleich der Genkarten von mtDNA aus Mensch und <u>S.cerevisiae</u> .	19
Fig. 3	Vereinfachte Darstellung der Reifung des COB-Primärtranskriptes zu Cytochrom b mRNA .	20
Fig. 4	Wachstumsraten und relative Aktivitäten von Atmungskettenphosphorylierungs-Enzymen des Wildtyps SC 167 bei Anzucht in Ggw. spezifischer Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung und cytoplasmatischen Proteinsynthese .	49
Fig. 5	Wachstumsraten und relative Aktivitäten von Atmungskettenphosphorylierungs-Enzymen einer Proteinase B defekten Mutante (HP 232-2B) bei Anzucht in Ggw. spezifischer Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung .	52
Fig. 6	Wachstumsraten und relative Aktivitäten von Atmungskettenphosphorylierungs-Enzymen einer Proteinase A defekten Mutante (H6 I-2 11A) bei Anzucht in Ggw. spezifischer Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung .	54
Fig. 7	Veränderung der Enzymaktivitäten der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in Wildtyp Hefe-Mitochondrien im Verlauf der Anzucht in 22 C Laktat-Medium .	56
Fig. 8	Wachstumsverhalten , Atmungsraten und Enzym-Aktivitäten der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung von Wildtyp-Hefe in Ab-	

	hängigkeit von verschiedenen Kohlenstoff- quellen .	59
Fig. 9	Inaktivierungskinetiken der Atmungsketten- enzyme von ausgewählten pet-ts Mutanten bei Kultivation unter nicht-permissiven Beding- ungen .	63
Fig. 10	Zusammenhänge bei Mehrfachdefekten in pet- ts Mutanten .	85
Fig. 11	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von an- gereicherter oligomycinsensitiver ATPase .	88
Fig. 12	Cytochrom-Spektrum (a) und SDS-Polyacryl- amidgel-Elektrophorese (b) von gereinigtem Komplex III aus Bäckerhefe .	89
Fig. 13	Cytochrom-Spektrum (a) und SDS-Polyacryl- amidgel-Elektrophorese (b) von gereinigter Cytochromoxidase aus Bäckerhefe .	89
Fig. 14	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von gereinigter Cytochromoxidase und daraus präparativ isolierter Untereinheiten .	90
Fig. 15	"Western-blot" Analyse von gereinigter Cyto- chromoxidase .	92
Fig. 16	"Western-blot" Analyse der Zellextrakte ausgewählter pet-ts Mutanten .	95
Fig. 17	Hydroxylapatit-Säulenchromatographie von mtDNA .	98
Fig. 18	Farbstoff/CsCl-Dichtegradienten Zentrifu- gation von SC 167 mtDNA .	99
Fig. 19	Restriktionsspaltung von SC 167 mtDNA .	99
Fig. 20	Vergleich der Elektrophorese-Bandenmuster verschiedener Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA .	102
Fig. 21	Eco RI- und Eco RI/Sal I-Restriktionsspaltung von SC 167 mtDNA .	104

Fig. 22	Vergleich von Einfach- und Mehrfach- Restriktionsspaltungen der SC 167 mtDNA .	104
Fig. 22	Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA .	105
Fig. 26		108
Fig. 27	Vergleich der Eichkurven zweier verschie- dener Methoden zur Größenbestimmung von DNA-Restriktionsfragmenten .	112
Fig. 28	Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA	115
—	zur Größenbestimmung der Restriktions- fragmente .	—
Fig. 32		119
Fig. 33	"Southern-blot" Hybridisierung von re- striktionsgespaltener SC 167 mtDNA .	121
Fig. 46		134
Fig. 47	Restriktionskarte der mitochondriellen DNA des <u>S.cerevisiae</u> Stammes SC 167 .	151
Fig. 48	Vergleich dreier Restriktions-Bandenmuster der <u>S.cerevisiae</u> Stämme SC 167 und KL14-4A .	153
Fig. 49	Vergleich der mtDNA-Genkarten von zwei <u>S.ce- revisiae</u> Stämmen SC 167 (a) und KL14-4A (b) .	154
Fig. 50	Genkarten der Plasmid-Vektoren pBR 325 (a), pBR 329 (b) und pUR 222 .	159
Fig. 51	Selbstligation von Plasmid-Vektoren .	160
Fig. 52	"Miniscreens" zur Analyse der Plasmid-DNA's rekombinanter <u>E.coli</u> -Klone .	163
Fig. 53	Koloniehybridisierungen von <u>E.coli</u> -Klonen aus einem Transformationsexperiment .	163
Fig. 54	"Southern"-Hybridisierung von klonierten mtDNA-Fragmenten .	165
Fig. 55	Klonierte KL14-4A mtDNA Eco RI-Fragmente .	166
Fig. 56	Klonierte mtDNA-Restriktionsfragmente aus den Hefestämmen SC 167 (a) und KL14-4A (b) .	167

Fig. 57	Gelelektrophoretische Charakterisierung rekombinanter Plasmide einer Klonierung von KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III-Fragmenten .	168
Fig. 58	Mitochondrielle Translationsprodukte in nuklearen pet-ts Mutanten .	170
Fig. 59	Vergleich von "Northern-blot" Hybridisierungen der Gesamt-RNA und mtRNA des Wildtyps SC 167 .	172
Fig. 60	Vergleich der Agarosegel-Elektrophorese Bandenmuster von , nach verschiedenen Methoden isolierten , mtRNA's .	175
Fig. 61	Vergleich von mtRNA Bandenmustern in vier verschiedenen Gelelektrophorese-Systemen .	176
Fig. 62	Vergleich der "Northern" Hybridisierungen von mtRNA nach Transfer aus zwei verschiedenen Elektrophorese-Systemen .	181
Fig. 63	Eingesetzte OXI 3 mtDNA-Proben zur "Northern" Hybridisierung .	181
Fig. 64	"Northern-blot" Analyse der mtRNA aus pet-ts Mutanten unter Verwendung der mtDNA-Probe b .	183
Fig. 65	"Northern-blot" Analyse der mtRNA aus pet-ts Mutanten unter Verwendung der mtDNA-Probe a .	185
Fig. 66	"Northern-blot" Analyse der mtRNA aus pet-ts Mutanten unter Verwendung der mtDNA-Probe c .	185
Fig. 67	Nachweis von Transkriptreifungs-Defekten in pet-ts Mutanten mit spezifischem Cytochromoxidase Untereinheit I Defekt .	189
Fig. 68	Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus pet-ts Mutanten die spezifisch Cytochromoxidase Untereinheit I defekt waren .	195
Fig. 69	Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus pet-ts Mutanten die spezifisch Cyto-	

	chromoxidase Untereinheit I und II defekt waren .	196
Fig. 70	Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus pet-ts Mutanten die einen spezifischen Defekt aufwiesen , (a) der Cytochromoxidase Untereinheit II , (b) des Cytochroms b , (c) des var-Proteins und (d) der gesamten mitochondrialen Proteinsynthese .	197
Fig. 71	Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus Wildtyp (SC 167) und ausgewählten pet-ts Mutanten .	199
Tab. 1	Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten .	67
Tab. 8		79
Tab. 9	Auftreten zusätzlicher Restriktionsschnittstellen in bestimmten Restriktionsfragmenten von SC 167 mtDNA .	110
Tab. 10	Datenauszug zur computergestützten Größenbestimmung von DNA-Fragmenten .	113
Tab. 11	Restriktionsanalyse von SC 167 und KL14-4A mtDNA .	137
Tab. 12	Ergebnisse von Klonierungsexperimenten .	162
Tab. 13	pet-ts Mutantenstämme aus denen mtRNA für Transkriptionsuntersuchungen isoliert worden war .	191

Benutzte Abkürzungen

A	Absorption
a, a ₃	Cytochrome a
ac	Acetat
ade	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ap	Ampicillin
Ap ^r	Ampicillin resistent (Resistenz)
b	Cytochrom b
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
c, c ₁	Cytochrome c
Cm	Chloramphenikol
Cm ^r	Chloramphenikol resistent (Resistenz)
Cm ^s	Chloramphenikol sensitiv (Sensitivität)
CoA	Coenzym A
Cpm	Zählereignisse pro Minute
dCTP	Desoxi-cytidintriphosphat
cyt b	Cytochrom b
DAPI	Diamino-phenylindol
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethyl-sulfoxyd
DNA	Desoxyribonuleinsäure
ctDNA	DNA aus Kalbsthymus
cytDNA	Kern-DNA
mtDNA	mitochondrielle DNA
DTT	Dithiothreitol
EACA	-amino-n-capronsäure
EC	Enzyme Comission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
fl.	flüssig (e,er)

g	Gramm
x g	-fache Erdbeschleunigung
mtGenom	mitochondrielles Genom
dGTP	desoxi-guanosintriphosphat
hr	Stunden
Hz	Hertz, Schwingungen pro Sekunde
kb	Kilobasenpaare
KE	Klett-Einheiten
LiDS	Lithium-dodecylsulfat
M	Molar
mA	Milliampere
Mops	4-morpholinopropan-sulfonsäure
NADH	Nicotin-adenin-dinukleotid reduziert
Na-PO ₄	Natriumphosphat-Puffer
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAB	p-amino-benzamidin
pet	petit
PMSF	Benzylfluorsulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg Einheiten
S.	Saccharomyces
SDS	Natrium-dodecylsulfat
Tc	Tetracyclin
Tc ^r	Tetracyclin resistent (Resistenz)
Tc ^s	Tetracyclin sensitiv (Sensitivität)
Tricin	Tris(hydroximethyl)methylglycin
Tris	Tris(hydroximethyl)aminomethan
ts	temperatursensitiv
dTTP	Desoxi-thymidintriphosphat
U	Enzymeinheiten
UMP	Uridinmonophosphat
V	Volt
Vol.	Volumen

I. Einleitung

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in allen eukaryontischen, aerob lebenden Organismen vorkommen. Sie enthalten eine eigene DNA sowie einen eigenen Transkriptions- und Translationsapparat (1). In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich die Multienzymsysteme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung, während in der Matrix u.a. die Enzyme des Trikarbonsäurezyklus und oft auch die der Fettsäure β -Oxidation enthalten sind. Die mitochondriale DNA liegt – mit wenigen Ausnahmen – als zirkuläre, doppelsträngige DNA vor (2). Die Größe des mitochondriellen Genoms schwankt je nach Organismus zwischen 15 und 2500 kb (3,4). Im Menschen beträgt die Länge der mtDNA 15.8 kb (5), in der Hefe *S.cerevisiae* etwa 70 kb (6).

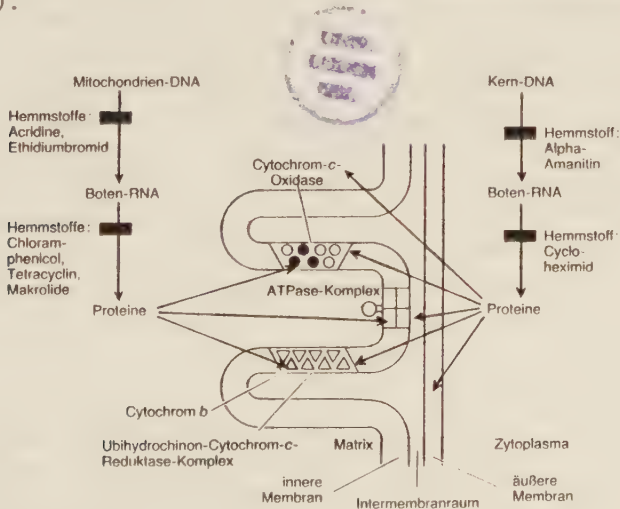


Fig.1 Schematische Darstellung der Herkunft und Lokalisation einiger Komponenten der inneren Mitochondrienmembran. Entnommen aus (8).

In Hefe konnten bisher acht mitochondriell synthetisierte Proteine identifiziert werden (7). Es sind dies das Apo-Cytochrom b, die Untereinheiten I, II und III der Cytochromoxidase, drei ATPase Untereinheiten und das ribosomale Protein var1. Alle anderen in den Mitochondrien benötigten Proteine sind Kern-kodiert und müssen in das Mitochondrium importiert werden (vgl.Fig.1).

In Fig.2 sind die Genkarten von zwei verschiedenen, physikalisch und genetisch gut untersuchten mtDNA's, der des Menschen und der Hefe S.cerevisiae, dargestellt. Abgesehen von einer unterschiedlichen relativen Anordnung der Gene im Verhältnis zueinander, zeigt die menschliche mtDNA, eine außerordentlich dicht gepackte Anordnung, in der die Strukturgene lediglich durch tRNA-Gene getrennt sind. Diese eingelagerten tRNA's dienen gleichzeitig als Erkennungsstellen für RNAsen, die hier die einzelnen mRNA's und rRNA's aus dem zunächst polycistronischen, den gesamten Sinnstrang beinhaltenden mtDNA Transkript, ausschneiden. Demgegenüber ist die mtDNA der Hefe etwa fünfmal größer und auch anders strukturiert. Mit 18% weist sie den geringsten GC-Gehalt aller bekannten Genome auf, 50% des Genoms bestehen aus AT-reichen Sequenzen mit einem GC-Gehalt unter 5%. Diese sog. "Spacer"-Regionen liegen zwischen den Genen der Hefe mtDNA (9). Zusätzlich werden in der mtDNA außerhalb der Gene GC-"Cluster" in einem Umfang von etwa 10% der Genomgröße gefunden. Möglicherweise sind diese Strukturelemente mitverantwortlich für die bekannt hohe Rekombinationsrate in Hefe mtDNA (10).

Genetische Versuche mit sog. mit⁻-Mutanten haben ergeben, daß, wie Fig.2 zeigt, tatsächlich alle mitochondriell synthetisierten Proteine (s.o.) auch durch die mtDNA kodiert werden (11). Neben den Protein-Genen und den Gene für die 21S und 15S rRNA's, sowie für 25 verschiedene tRNA's, wurden außerdem bei Hefe noch 12 offene, aber bisher funktionell noch nicht charakterisierte Leserahmen, sog. "unassigned reading frames" (URF's), gefunden (8,12,13,14,15,16,17). Zwei von ihnen

tens 8 Introns, von denen 6 offene Leserahmen enthalten (17, 19). Genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß Mutationen in bestimmten Introns in trans wirken können (20). In Verbindung mit der Entdeckung der, potentiell für ein Protein kodierenden, offenen Leseraster in diesen Introns wurde die Vorstellung von Intron-kodierten "Maturasen" entwickelt, die an der Reifung des Primärtranskriptes eines Mosaik-Gens beteiligt sind (13). Im Falle des COB-Gens ist dies eingehend untersucht worden. Dabei hat sich gezeigt, daß auch Kern-kodierte Prozessier-Enzyme nötig sind (21). In Fig.3 ist ein Schema der Reifung des COB-Transkriptes gezeigt. Im einzelnen

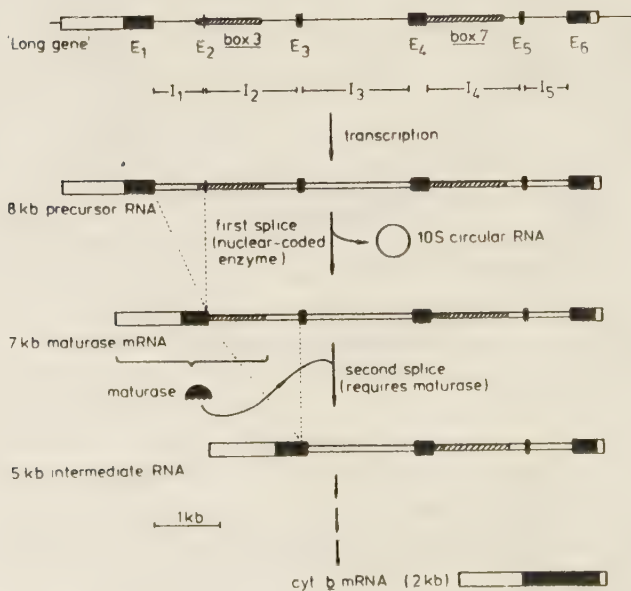


Fig.3 Vereinfachte Darstellung der Reifung des COB-Primärtranskriptes zur Cytochrom b mRNA. Entnommen aus (22).

wird im Falle des COB-Gens durch Herausschneiden des ersten Introns bI_1 aus dem Primärtranskript unter Wirkung einer Kern-kodierten Maturase, Exon B_1 mit Exon B_2 verknüpft. Von den so fusionierten Exons und dem unmittelbar anschließenden offenen Leserahmen in Intron bI_2 wird nun ein chimäres Protein synthetisiert, welches Intron bI_2 aus dem COB-Transkript herausschneidet und somit seiner eigenen weiteren Synthese die Grundlage entzieht. Besonders interessant ist auch der Befund, daß Mutationen in Intron bI_4 des COB-Gens zum Ausfall sowohl von Cytochrom b als auch der Untereinheit I der Cytochromoxidase (OXI 3 Genprodukt) führen. Es stellte sich heraus, daß in COB-Intron bI_4 eine Maturase kodiert wird, die sowohl zum Herausschneiden dieses Introns, als auch zum Herausschneiden des Introns aI_4 aus dem OXI 3-Transkript benötigt wird (20).

Es scheint somit wahrscheinlich, daß auch an den übrigen Reifungsschritten der COB- und OXI 3-Transkripte teils mtDNA-teils Kern-kodierte Maturasen beteiligt sind. Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war es, die Existenz Kern-kodierter Prozessier-Enzyme die zur Reifung von mtDNA-Transkripten beitragen, nachzuweisen und ihre Wirkungsweise zu untersuchen.

In den vergangenen Jahren waren am hiesigen Institut ca. 4000 Kern-kodierte, temperatursensitive, atmungsdefekte Hefe-Mutanten isoliert worden, und mit ihnen ca. 290 verschiedene Komplementationsgruppen (Gene) genetisch charakterisiert worden. Die Mutanten zeichnen sich dadurch aus, daß sie bei niedriger, sog. permissiver Temperatur (22°C) in ihrem Verhalten dem Wildtyp gleichen, bei erhöhter, nicht-permissiver Temperatur (36°C) jedoch auf einer Kohlenstoffquelle wie Laktat, die nur veratmet werden kann, nicht mehr wachstumsfähig sind. Solche Mutanten können dazu dienen, mehr zu erfahren über die Struktur, die funktionelle Organisation und die Regulation von Aktivität und Synthese der enzymatischen Komponenten der mitochondriellen Atmungskette. Dieses komplexe Enzymsystem ist insbesondere deshalb so interessant, weil zu seiner Synthese und Funktion zwei verschiedene Genome, das mitochondrielle

und das nukleare , zusammenarbeiten müssen . Von den insgesamt in den Mitochondrien enthaltenen Proteinen werden zwar mehr als 95 % von Kern-Genen kodiert , die acht Strukturgene einiger essentieller Komponenten liegen jedoch , wie weiter oben bereits geschildert , auf der mtDNA . Die gemischte Zusammensetzung wichtiger Enzymkomplexe der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung aus Kern- und Mitochondrien-kodierten Untereinheiten ist ein Beispiel für die erwähnte Zusammenarbeit der beiden Genome .

Zur Biosynthese funktionierender mitochondrieller Enzymsysteme gehört weiter , daß im Cytoplasma synthetisierte Proteinkomponenten in die Organelle transportiert und dort an der richtigen Stelle eingebaut werden . Für diese Transportvorgänge wurden mindestens zwei verschiedene Mechanismen als wirksam erkannt (23) : nach dem einen wird zunächst eine Vorstufe des Proteins , welche an ihrem N-Terminus gegenüber dem reifen Endprodukt eine Verlängerung , ein sog. Signalpeptid trägt , synthetisiert . Dieses erleichtert das Eindringen bzw. den Durchgang des Proteins durch die Mitochondrienmembran und wird dabei oder danach durch spezifische proteolytische Enzyme abgespalten . Ein weiterer Mechanismus , der zum Beispiel bei Apo-Cytochrom c vorliegt (24) , benötigt für den Übergang aus dem Cytoplasma keine Signalsequenz , sondern nur einen spezifischen Carrier . Triebkraft für diesen Übergang ist wahrscheinlich die Umwandlung von Apo-Cytochrom c in das Holoenzym (25) . Auch für diese , für die Mitochondrien-Funktion wichtigen Prozesse sind wahrscheinlich ausschließlich Kern-kodierte Proteine nötig .

Eine dritte Klasse Kern-kodierter Funktionen wurde offenkundig , nachdem die Mosaikstruktur einiger Mitochondrien-Gene nachgewiesen worden war . Zur vollständigen Reifung der primären Transkripte solcher Gene sind , wie weiter oben bereits geschildert , sowohl mitochondriell kodierte wie auch Kern-kodierte Nukleasen nötig .

Im einzelnen hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, zunächst Vertreter verschiedener pet-Komplementationsgruppen auf ihre enzymchemischen Defekte innerhalb der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung zu untersuchen. Hierbei sollten, wenn möglich, Gen/Funktions-Zuordnungen vorgenommen und strukturelle oder regulatorische Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Komponenten dieses Multienzymsystems erkannt werden. In einem weiteren Teil der Arbeit sollte auf die Abhängigkeit der korrekten Reifung der Transkripte bestimmter mitochondrieller Gene von Kern-kodierten Funktionen näher eingegangen werden. Die Untersuchung der Transkription und des Transkript-Reifungsprozesses beim OXI 3-Gen (Cytochrom-oxidase Untereinheit I), dem strukturell komplexesten Mosaikgen in Hefe-mtDNA, stand dabei im Vordergrund. Als Voraussetzung für diese Untersuchungen wurde in einem weiteren Teil der Arbeit eine Restriktionskarte der mtDNA des von uns Benutzten Hefestammes SC 167 und die Klonierung geeigneter OXI 3 DNA-Fragmente durchgeführt.

II. Material und Methoden

1. Geräte

Autoklav (Typ A 5 Webeco , Bad Schwartau) , Schüttler (New Brunswick Modell G 25 , USA) , Rolltrommel (Modell TC 5 New Brunswick , USA) , Kolorimeter zur Zelldichtebestimmung (Klett-Summerson Typ 800-3 mit Blaufilter Nr.42 und Grünfilter Nr. MFG Co.Inc., New York) , Spektralphotometer (Gilford Modell 250 mit Schreiber Modell 1100 und Aminco DW-2 UV/VIS) , Zellhomogenisator (Typ MSK , Braun , Melsungen und Manton-Gaulin , Manton-Gaulin Mfg.Co.Inc., Everett, Mass.USA) , Durham-Röhrchen (40 x8 mm, Waldeck , Münster) , Ultraschallgerät (Sonifier B 12 , Branson) , Oscillograph (OSC-3C , Yizreel Electronics) , Ultraschallmeßzelle (UT-5 nach Prof.Gersonde , Aachen) , Sauerstoffelektrode (Rank Brothers , Cambridge U.K.) , Kompensationsschreiber (Servogor RE 211) , Thermostaten und Wasserbäder (Exatherm U 3 electronic , Julabo ; Thermomix GFL , Braun , Melsungen) , Glasperlen (Wild , Bayreuth) , Kühlzentrifugen (Sorvall Superspeed RC-5 und Beckmann J 21 B) , Ultrazentrifuge (Beckmann L5-65) , Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5412) , Durchlaufzentrifuge (Cepa LE , Carl Padberg , Lörrach) , Waagen (Mettler P 1000 N , P 1200) , Mikrowaage (Sartorius 2415) , Mikroskop (Zeiss Standart 14) , pH-Meter (Knick 511) , Automatikpipetten (Gilson Pipetman und Finnpipette) , Netzgerät (Desaga Modell 500/500) , Brutschrank (Heraeus VI 5050 EK) , Folienschweißgerät (FG 2 , Bosch) , UV-Lampe (Desaga , Mini UVIS) , Sample Concentrator (Isco 1750 , Isco Inc., Lincoln , Neb.USA) , Szintillationsmesser (Typ 5-40 , Mini Instruments Ltd. , Essex U.K. und Tricarb Modell 13320 , Packard Instruments Co.Inc., Frankfurt) , Vakuumzentrifuge (Speed Vak , Bachofer , Reutlingen) , Röntgenfilme (Fuji RX 100) , Verstärkerfolien (Du Pont Cronex) , Kamera (Polaroid MP 4, Film (Polaroid 665) .

2. Chemikalien

Die folgenden Substanzen wurden gekauft :

K-acetat, Mg-acetat, Na-acetat, Ammoniummolybdat, Ammoniumperoxydisulfat, Barbitat, Bernsteinsäure, Borsäure, CaCl, CsCl, DMSO, EDTA, EtBr, Ether, Folin-Reagenz, Formaldehyd, Formamid, Glycerin, i-Propanol, Jodessigsäure, KCN, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $K_3Fe(CN)_6$, Mercaptoethanol, Natriumborant, NaCl, NaOH, $Na_2S_2O_4$, $Na_2S_2O_5$, Phenol, PMSF, Photorex, RbCl, Sorbit (Merck, Darmstadt).

Agarose (low EEO), Na-2-aminosalicylat, BSA (Fr.V), m-Cresol, DAPI, DL-Galaktose, 8-Hydroxichinolin, Sepharose 2 B, Sepharose CL 6 B 200 (Sigma GmbH, Taufkirchen).

Ammoniumsulfat, Ampicillin, Antimycin A, Bisacrylamid, Bisbenzimid, Bromphenolblau, Chloramin T, DTT, Coomassie Brilliant Blue G 250, FACA, Fluram, Harnstoff, Kakodylsäure, Mannit, Na-tri-isopropyl-naphthalindisulfonat, Oligomycin, PAB, Acrylamid, Sarkosyl, SDS, Temed, Tetracyclin, Tricin, Triton X-100, Xylencyanol (Serva, Heidelberg).

Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-trypton, Freund'sches Adjuvans, Hefeextrakt (Difco, Detroit USA).

Adenin, ATP, dCTP, dGTP, dTTP, Guanosin, NADH (Böhringer, Mannheim).
Milchsäure, Tri-Na-citrat (Roth, Karlsruhe).

Saccharose (Bäko, Erlangen).

Antibiotic Medium Nr.3, Nutrient Broth (Oxoid, Wesel)

Biogel A 50 m, Mixed Bed Resin AG 501 x 8 (Bio Rad, München).

Ficoll 400, Polyvinylpyrrolidon (Pharmacia, Freiburg).

$\alpha^{32}P$ -dATP = 3000 Ci/mmol, $Na^{125}I$ 100 mCi/ml (Amersham Buchler Braunschweig).

Nitrocellulosefilter BA 85 (Schleicher & Schüll, Dassel).

Quickszint 212 (Zinsser, Frankfurt).

Filterpapier Whatman 3MM (Whatman, Maidstone U.K.).

Papierhandtücher (R-100, Apura GmbH, Mainz)

3. Enzyme

Folgende Enzyme wurden gekauft :

Bam HI, Bgl II, Cla I, Eco RI, Hind III, Pst I, Pvu II, Sal I, Sma I, Xba I, Xho I, DNase I, DNA-Polymease I, RNase (Böhringer, Mannheim).

Alu I, Hpa II, Msp I, T₄-Ligase (New England Biolabs GmbH, Schwalbach).

Hinc II, Hinf I (BRL GmbH, Neu Isenburg).

Lysozym (Serva, Heidelberg).

Micrococcus Nuklease (Sigma, Taufkirchen).

Alkalische Phosphatase (Worthington Inc., Freehold, New Jersey USA).

Zymolyase 60000 (Miles GmbH, Frankfurt)

4. Hefestämme

Als Wildtyp-Hefe wurde der genetisch definierte Stamm SC 167 (α , adel; erhalten von Dr. M. Esposito, Chicago) verwendet. Die in dieser Arbeit untersuchten pet-ts Mutanten standen am hiesigen Institut zur Verfügung und leiteten sich von dem Stamm SC 167 ab (26). Der Wildtyp-Stamm KL14-4A (a, his1, trp2, ω^+ , cap^r, ery^s, oli^r, par^s) (27) wurde von Dr. G. Michalis (Bielefeld) erhalten. Die Proteinase A- und B-defekten Stämme H6 I-2 11A (a, pra⁻) und HP 232-2B (α , prb⁻) wurden von Dr. H. Wolf (Freiburg) zur Verfügung gestellt.

5. Bakterienstämme

Folgende E. coli K12 Stämme wurden benutzt :

RR 1 (pro, leu, thi, lac Y, hsd R, end A, rps L20, gal K2, xgl-5, mt1-1, sup E44) (28).

SK 2881 (F⁻, gal, lac, sr1, leu C, thi, T1, R, hsd R4, rec A, sbc B15, end A) (29).

JM 103 ((lac, pro)_{del}, thi, str A, end A, sbc B15, hsd R4, sup E, F⁻, tra D36, pro AB, lac I^Q Z del M15) (30).

6. Medien

- a) Hefeextrakt-Pepton-Medium (YEP)
1 % Saccharose , 0.6 % Pepton , 0.3 % Hefeextrakt , 0.5 % KH_2PO_4 , 0.5 % K_2HPO_4 , 0.01 % Adenin , 0.005 % Guanosin
- b) Milchsäure-Medium (LAC)
3 % K-Laktat pH 5.5 , 0.6 % Pepton , 0.3 % Hefeextrakt , 0.01 % Adenin , 0.005 % Guanosin , 2 % Ethanol .
- c) Galaktose-Medium (GAL)
1 % Galaktose , 1 % Pepton , 1 % Hefeextrakt , 0.01 % Adenin , 0.005 % Guanosin .
- d) Luria Broth (LB)
1 % Bacto-Trypton , 0.5 % Hefeextrakt , 1 % NaCl , pH 7.6
- e) Penassay-Medium (PA)
1.75 % Antibiotic Medium No.3
Antibiotika wurden zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml zugesetzt (nach dem Autoklavieren).
- e) Z Broth (ZB)
1.6 % Nutrient broth , 1 % Pepton , 0.2 % Glukose pH 7.5

Die Medien wurden 20 min autoklaviert . Zur Herstellung von festen Nährböden wurden jeweils 2 % Agar zugesetzt .

7. Plasmide

Folgende Plasmid-Vektoren wurden benutzt :

- pBR 325 (Ap^r , Cm^r) (31)
- pBR 329 (Ap^r , Cm^r , Tc^r) (32)
- pUR 222 (Ap^r , $\text{po Z}'$) (33)

8. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry bestimmt (34). Als Eichstandard diente Rinderserumalbumin .

9. Nukleinsäurebestimmungen

Nukleinsäurekonzentrationen wurden anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Als Umrechnungsfaktor wurde für RNA 1 OD = 40 µg/ml und für DNA 1 OD = 50 µg/ml angenommen.

10. Herstellung stabiler Präparationen submitochondrieller Partikel

Die Darstellung submitochondrieller Partikel zur Bestimmung der Atmungskettenenzym-Aktivitäten in pet-ts Mutanten erfolgte wie in (35) beschrieben.

11. Enzymtests

Die Aktivitäten der Enzyme Ferrocycytochrom c:O₂ Oxidoreduktase (EC 1.9.3.1), NADH:Cytochrom c Oxidoreduktase, Succinat:Cytochrom c Oxidoreduktase, NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (EC 1.6.5.3) und ATP-Synthase (EC 3.6.1.3) wurden wie in (35) bestimmt. Die Aktivität des Enzyms Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1) wurde wie in (36) bestimmt.

12. Bestimmung der Atmungsraten von Hefezellkulturen mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode

Die Messung der Atmungsraten wurde wie in (35) durchgeführt.

13. Bestimmung des Anteils an Revertanten und rho⁻-Mutanten in Hefezellkulturen

Diese Tests wurden wie in (36) beschrieben durchgeführt.

14. Isolierung von Cytochromoxidase

Die Isolierung des Enzyms Cytochromoxidase aus käuflicher Bäckerhefe (Fa.Bast, Nürnberg) folgte grundsätzlich den Angaben von T.L.Mason et.al. (37).

15. Isolierung von Komplex III aus Bäckerhefe

Die Isolierung des bc_1 -Komplexes aus käuflicher Bäckerhefe (Fa.Bast, Nürnberg) erfolgte nach der Methode von G.Palmer (38) unter Zusatz von Antimycin A wie bei M.B.Katan et.al.(39) beschrieben.

16. Isolierung von oligomycinempfindlicher ATPase aus Bäckerhefe

Mitochondrielle ATPase aus Hefe wurde wie folgt isoliert: 100 g käufliche Bäckerhefe (Fa.Bast, Nürnberg) wurden in 150 ml 250 mM Mannit / 10 mM Tris-ac pH 7.5 / 2 mM EDTA / suspendiert und mit demselben Puffer durch Zentrifugation (3000 x g, 1 min, 4°C) und resuspendieren, 2 x gewaschen. Die gewaschene Hefe wurde in 125 ml 500 mM Mannit / 50 mM Tris-ac pH 7.5 / 2 mM EDTA / 2 mM ATP / 2 mM PMSF / 10 mM PAB / 10 mM EACA / 0.2 % BSA suspendiert. Die Zellen wurden im Braun-Zellhomogenisator mit Glasperlen (0.5 mm $\varnothing$) in 30 ml Portionen durch 30 sec Schütteln aufgeschlossen. Zelltrümmer und Zellkerne wurden durch Zentrifugation (1300 x g, 2 min, 4°C) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation (17000 x g, 8 min, 4°C) pelletiert. Die Mitochondrien wurden in 60 ml 250 mM Mannit / 10 mM Tris-ac pH 7.5 / 2 mM EDTA / 2 mM ATP / 0.5 mM PMSF / 5 mM PAB / 5 mM EACA suspendiert und zentrifugiert (1300 x g, 3 min, 4°C). Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien erneut abzentrifugiert (24000 x g, 8 min, 4°C). Der Vorgang des Suspendierens und Zentrifugierens wurde 2 x wiederholt. Die so gewaschenen Mitochondrien wurden in 60 ml 250 mM Saccharose / 50 mM Tricin-OH pH 8.0 / 2 mM EDTA / 5 mM PAB / 5 mM EACA / 2 mM ATP aufgenommen und die Sus-

pension jeweils 0.5 %ig an Triton X-100 und Na-Cholat (pH 7.6) gemacht. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurde die Suspension in der Ultrazentrifuge geklärt (38000 x g, 1 hr, 4°C, Rotor 60Ti). Der Überstand wurde mit ges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 7.0) auf 35 % Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebracht, 20 min bei 4°C gerührt und anschließend zentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 3 ml 5 mM Tricin-OH pH 7.5 / 1 mM ATP / 2 mM EDTA / 2 mM DTT / 0.1 % Triton X-100 / 5 % Methanol aufgenommen und einer Säulenchromatographie an Ultrogel AcA 34 unterworfen. Die Säule (50 x 1.8 cm) wurde mit 10 mM Tricin-OH pH 7.5 / 10 mM Na-ac / 0.2 mM EDTA / 0.5 mM ATP / 0.2 mM DTT / 0.1 % Triton X-100 / 10 % Methanol äquilibriert und eluiert. Die durch Aktivitätsmessung ermittelten Spitzenfraktionen wurden vereinigt, über Saccharose konzentriert und bei -20°C aufbewahrt.

17. SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Charakterisierung von Cytochrom-oxidase, bc_1 -Komplex, ATPase und Zellextrakten wurde mit vertikalen Flachgelen (1.5 mm Dicke) in dem Puffersystem von Lämmli (40) durchgeführt. Bis zum vollständigen Einwandern der Proben in das Sammelgel wurde eine Stromstärke von 30 mA angelegt, danach wurde die Stromstärke für die restliche Laufzeit (2-3 hr) auf 80 mA erhöht. Nach Elektrophorese wurden die Gele entweder einem "Western-Transfer" unterworfen oder mit 45.5 % (v/v) Methanol / 9.1 % (v/v) Essigsäure / 0.05 % Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt, mit 7.5 % (v/v) Essigsäure / 5 % (v/v) Methanol entfärbt und photographiert.

Für die präparative Isolierung von Untereinheiten der Cytochromoxidase mit Hilfe der oben erwähnten Flachgele wurde das aufzutrennende Protein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluram markiert, indem zu je 1 ml SDS-denaturiertem (40) Protein (1 mg / ml) 0.5 mg Fluram (25 mg/ml in trockenem Aceton) unter starkem Durchmischen zugesetzt wurden. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Banden unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Die so ge-

trennten Untereinheiten wurden aus den , in einen Dialyseschlauch eingeschlossenen , Gelstückchen in Elektrophoresepuffer elektroeluiert , auf Saccharose konzentriert und bei -20°C aufbewahrt .

18. Gewinnung von Antikörpern

Antikörper aus Kaninchenserum gegen Cytochromoxidase , bc_1 -Komplex und ATPase wurden wie in (35) beschrieben gewonnen .

19. "Western-blot"-Hybridisierung

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosefilter wurde wie von Vaessen et. al. beschrieben durchgeführt (41). Für den immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurden 20 µg Antikörper (40 mg/ml in 0.9 % NaCl , Titer 1:32 gegen 1 mg/ml Antigen) und 1×10^6 Cpm ^{125}J -markiertes Protein A eingesetzt . Protein A wurde wie von Glover et. al. beschrieben (42) mit ^{125}J markiert .

20. Isolierung von Mitochondrien zur Gewinnung von mtDNA und mtRNA aus Hefe

Mitochondrien zur mtDNA- bzw. mtRNA-Isolierung wurden prinzipiell nach der "handshake"-Methode von Lang et. al. (43) gewonnen . Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen :

Hefezellen (späte log-Phase) wurden durch Zentrifugation (2500 x g , 30 sec , 4°C) geerntet und einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen . Die Zellen wurden zu 2 ml/g Feuchtgewicht mit 1 M Sorbit / 20 mM Tri-Na-citrat pH 7.5 / 0.1 M EDTA / 0.3 M Mercaptoethanol aufgenommen , 0.5 mg/g Feuchtgewicht Zymolyase 60 000 zugesetzt und ca. 1 hr bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert . Die Sphäroplastierung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert , indem Proben der inkubierten Suspension mit 2 % SDS-Lösung gemischt (1:1) und der Prozentsatz der so entstan-

denen sog. "Ghosts" geschätzt wurde. Bei Erreichen eines Anteils von mehr als 90 % Sphäroplasten wurden diese durch Zentrifugation geerntet (1500 x g, 30 sec, 4°C) und zu 5 ml/g Feuchtgewicht mit Aufschlußpuffer (0.9 M Sorbit / 0.1 M Tris-Cl pH 7.5 / 10 mM EDTA / 0.1 % BSA) in einem dicht verschließbaren sterilen Zentrifugenbecher resuspendiert. Es wurden so viele kalte, säuregewaschene, trockene, sterile Glasperlen (0.5 mm ϕ) zugegeben, daß die Glasperlen bis auf 1 cm an die Flüssigkeitsobergrenze heranreichten. Durch heftiges, 3-4 minütiges Schütteln von Hand (Amplitude 50 cm, 2 Hz) wurden die Sphäroplasten aufgeschlossen. Dabei wurde das Schütteln jeweils nach 30 sec unterbrochen und die Sphäroplasten-Suspension auf Eis abgekühlt. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgegossen, die Glasperlen mit 5 40 ml-Portionen Aufschlußpuffer gewaschen und alle Überstände vereinigt. Aus ihnen wurden durch 15 minütiges Zentrifugieren (1500 x g, 4°C) Zelltrümmer und Zellkerne entfernt. Aus dem dabei erhaltenen Überstand wurden schließlich die Mitochondrien durch 20 minütige Zentrifugation (15 000 x g, 4°C) pelletiert.

21. Isolierung von mtDNA aus intakten Hefemitochondrien

Nach den Angaben von Hudspeth et.al. (44) wurden frisch isolierte Hefemitochondrien (s.o.) zu 7 ml/g Feuchtgewicht (an Hefezellen aus denen die Mitochondrien isoliert worden waren) in 10 mM Tris-Cl pH 8.2 / 10 mM EDTA / 100 mM NaCl suspendiert, 2%ig an Sarkosyl gemacht und 1 hr bei RT unter gelegentlichem leichtem Schütteln lysiert. Nach Zugabe von 1.26 g CsCl / ml Lysat wurde noch 12 hr bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ausgeflocktes Protein und Fett durch Zentrifugation (38 000 x g, 2 hr, 20°C) floriert und durch Abheben oder Umfüllen der Lösung entfernt. Zu der CsCl-haltigen Nukleinsäurelösung wurden 0.1 mg/ml Bisbenzimid in wässriger Lösung (10 mg/ml) unter gründlichem Durchmischen langsam zugesetzt. Nach Korrigieren der Dichte auf 1.40 mit Hilfe eines Refraktometers wurde die DNA durch Zentrifugation (40 000 x g, 48 hr, 20°C) bandiert.

Nach Zentrifugation wurde die obere, der mtDNA entsprechende Bande, unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens mit einer Kanüle (Nr.1) abgezogen. Der Farbstoff wurde durch dreimalige Extraktion mit CsCl-gesättigtem i-Propanol entfernt. Die Abtrennung von CsCl erfolgte durch gelchromatographisches Entsalzen über ein Biogel A 50 m-Säule (25 x 0.8 cm), die mit 10 mM Tris-Cl pH 8.0 / 1 mM EDTA äquilibriert war. Die vereinigten Spitzenfraktionen des DNA-Peaks wurden mit 0.5 Vol. 7 M (NH₄)₂SO₄ versetzt und mit 2 Vol. kaltem Ethanol (-20°C) gefällt und entweder 12 hr bei -20°C belassen oder in fl. N₂ eingefrohren. Nach anschließender Zentrifugation (10 000 x g, 10 min, 4°C) wurde die pelletierte DNA getrocknet, zu 1 mg/ml in 10 mM Tris-Cl pH 8.0 / 1 mM EDTA aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

22. Isolierung von mtRNA aus intakten Hefemitochondrien

Die Isolierung von mtRNA erfolgte grundsätzlich nach der von van Ommen et.al. gegebenen Vorschrift (45). Im einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Frisch isolierte Hefemitochondrien (s.o.) wurden in 0.2 ml/g Feuchtgewicht an Hefezellen (aus denen die Mitochondrien isoliert worden waren) in 0.15 M NaCl / 0.015 M Na-citrat pH 7.0 aufgenommen und mit 1 Vol. 4 % SDS / 2 % Na-2-aminosalicylat / 1 % Na-tri-isopropyl-naphthalin-disulfonat / 6 % 2-Butanol lysiert. Nach Erhalten einer klaren Lösung wurde 4 x mit je 1 Vol. Phenol / m-Cresol / 8-Hydroxichinolin (100 : 14 : 0.1 ; v/v/w) extrahiert. Zur Phasentrennung wurde jeweils 5 min mit 6 000 x g bei RT zentrifugiert. Die zuletzt erhaltene wässrige Phase wurde durch Zusatz von 0.1 Vol. 3 M NaAc (pH 5.3) 0.3 M NaAc gemacht und mit 2.5 Vol. kaltem Ethanol (-20°C) gefällt (12 hr bei -20°C). Nach 20 min Zentrifugation mit 10 000 x g (4°C) wurde der Niederschlag getrocknet und zu 2 mg/ml in 10 mM Tris-Cl pH 7.5 / 0.5 % SDS aufgenommen. Eine solche Präparation kann bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden und bleibt auch bei mehrmaligem Auftauen und Wiedereinfrieren unverändert.

Zur RNA-Isolierung verwendete Glasgeräte sollten 4 hr bei 250°C sterilisiert, Plastikgefäße autoklaviert sein. Alle Lösungen, mit Ausnahme des SDS-haltigen Lysierungsgemisches und der Phenol-haltigen Extraktionslösung waren entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

23. Schnelle Isolierung von Plasmid- und Mitochondrien-DNA aus kleinen Hefemengen

Die Isolierung von Plasmid- und mt-DNA aus Hefe folgte grundsätzlich der Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien nach der von Holmes et.al. beschriebenen Methode (46).

Mit bidest. H₂O gewaschene Hefezellen (0.05-0.3 g) wurden in einem 1.5 ml Eppendorf-Reagiergefäß mit 200 µl 1.2 M Sorbit / 50 mM Na-PO₄ pH 7.5 / 20 mM EDTA / 1 % Mercaptoethanol suspendiert und mit 0.5 mg/ml Zymolyase 60 000 bei 37 C 10 min inkubiert. Nach 30 sec Zentrifugation (10 000 x g, 20 C) wurden die Sphäroplasten mit 0.35 ml 8 % Saccharose / 50 mM Tris-Cl pH 8.0 / 50 mM EDTA / 0.5 % Triton X-100 suspendiert und 25 µl einer frisch bereiteten Lysozym-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-Cl pH 8.0) zugesetzt. Nach Durchmischen wurde das Gefäß für exakt 40 sec in ein kochendes Wasserbad gegeben und anschließend sofort 10 min zentrifugiert (10 000 x g, 20°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben, mit 0.1 Vol. 3 M Naac pH 5.3 versetzt und mit 1 Vol. i-Propanol gefällt. Nach einfrieren in fl. N₂ und anschließendem 10 minütigem Zentrifugieren (10 000 x g, 20°C) wurde der Niederschlag mit Ether gewaschen und nach Trocknen in 10 mM Tris-Cl pH 8.0 / 1 mM EDTA aufgenommen.

24. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien sowohl in einem "Mini-screen"-Verfahren für kleine Bakterienmengen, als auch für die Präparative Isolierung von Plasmid-DNA im mg-Maßstab, wurde nach der von Birnboim et.al. (47) beschriebenen

Methode durchgeführt .

a) "Miniscreen"-Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.

Die Zellen aus 1 ml einer 12 hr-Kultur eines Plasmid-haltigen E.coli Stammes in Antibiotikum-haltigen Medium wurden in einem Eppendorf-Reagiergefäß durch Zentrifugation (10 000 x g, 10 sec, 20°C ,Eppendorf-Zentrifuge) geerntet . Die Zellen wurden in 100 µl 25 mM Tris-Cl pH 8.0 / 10 mM EDTA suspendiert und 200 µl einer frisch bereiteten Mischung von 0.2 M NaOH / 1 % SDS zugesetzt . Nach Lyse der Zellen wurden 150 µl 5 M Kac pH 4.8 zugegeben und die Mischung 3 min auf Eis inkubiert . Nach Zentrifugation (10 000 x g, 1 min, 20°C) wurden 360 µl abgehoben und in ein neues Reagiergefäß gegeben . Nach Auffüllen mit kaltem Ethanol (-20°C) und durchmischen wurde 5 min zentrifugiert (10 000 x g 20°C), Der Überstand wurde verworfen , das Präzipitat in 100 µl 50 mM Tris-Cl pH 8.0 / 0.1 M Naac aufgenommen und mit 2.5 Vol. kaltem Ethanol gefällt . Nach 5 min Zentrifugation (10 000 x g, 20°C) wurde im Vakuum getrocknet und anschließend der Niederschlag in 50 µl 10 mM Tris-Cl pH 8.0 / 1 mM EDTA gelöst . Diese DNA-Lösung kann bei 4°C aufbewahrt werden .

b) Isolierung von Plasmid-DNA aus 1 l-Kulturen von E.coli

Mit einer Einzelkolonie frisch ausgestrichener E.coli Zellen wurde eine 3 ml-Kultur in Antibiotikum-haltigem Medium angelegt . Nach 1 Tag Wachstum bei 37°C wurde mit dieser Vorkultur 1 l Antibiotikum-haltiges Medium angeimpft und die Kultur bis zu einer Zelldichte von 200 KE (Grünfilter Nr.54) bei 37°C geschüttelt . Zur Amplifizierung der Plasmide wurde je nach Plasmid entweder Chloramphenikol zu 120 µg/ml oder Spectinomycin zu 300 µg/ml zugesetzt und die Kultur weitere 12-16 hr bei 37°C geschüttelt . Die Zellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern geerntet (5 000 x g, 5 min, 4°C) und in 70 ml 50 mM Tris-Cl pH 8.0 / 10 mM EDTA suspendiert . Unter Kühlen wurden 15 ml 0.2 M NaOH / 1 % SDS (frisch zubereitet) zugegeben und nach Umschwenken die Suspension 3 min auf Eis inkubiert . Nach Zugabe von 7 ml Kac pH 4.8 wurde weitere 5 min auf Eis inkubiert .

Nach Zentrifugation (10 000 x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und 1.4 ml 5 M NaCl zugegeben . Nach Zusatz von 0.6 Vol. kaltem i-Propanol (-20°C) wurde die Mischung 1 hr bei -70°C stehengelassen . Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden anschließend abzentrifugiert (12 000 x g, 20 min, 4°C), der Überstand verworfen und der Niederschlag im Vakuum getrocknet . Nach Aufnehmen der Nukleinsäuren in 5 ml 50 mM Tris-Cl pH 8.0 / 10 mM EDTA wurden 50 µl RNase A (10 mg/ml , in 50 mM Naac pH 4.8 10 min gekocht) zugesetzt und 1 hr bei 37°C inkubiert . Anschließend wurde je einmal mit 1 Vol. Phenol (gesättigt mit 10 mM Tris-Cl pH 7.5 / 1 mM EDTA) und 1 Vol. Chloroform extrahiert . Zur Phasentrennung wurde jeweils zentrifugiert (6 000 x g, 10 min, RT). Die letzte wässrige Phase wurde 0.3 M an NaCl gemacht und die DNA wie oben mit 0.6 Vol. kaltem i-Propanol (-20°C) gefällt . Nach Zentrifugation (12 000 x g, 20 min, 4°C) wurde die DNA im Vakuum getrocknet und in 10 mM Tris-Cl pH 8.0 / 1 mM EDTA aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt .

25. Restriktionsspaltung von mt- und Plasmid-DNA

Zu Restriktionsspaltungen wurde 1 µg DNA mit jeweils 1.5 U der gewählten Restriktionsendonukleasen , sowohl in Einfach- wie auch in Mehrfach-Verdauungen, in einem Reaktionsvolumen von 20 µl , welches 33 mM Tris.Cl pH 7.9 / 66 mM Kac / 66 mM Naac / 10 mM Mgac / 0.5 mM DTT und 0.1 mg/ml BSA enthielt , für 2 hr bei 37°C inkubiert . Anschließend wurde das Verdauungsgemisch 5 min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt .

26. Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Proben

DNA-Proben wurden zur Restriktionsanalyse und Größenbestimmungen in Horizontalgelen (24 x 16 x 0.6 cm) der Zusammensetzung 0.5 % Agarose / 1 x TBE (1 x TBE - 90 mM Tris-Cl pH 8.3 / 90 mM Borsaure / 4 mM EDTA) mit 35 V für 16 hr elektrophoretisiert . Nach 15 min Färben mit EtBr-Lösung (1 µg/ml in dest. H₂O) und 15 min

Entfärben mit dest.H₂O wurden die Gele unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert (Polaroid MP 4 , Film 665). Diese Gele konnten anschließend noch zu einem "Southern-Transfer" herangezogen werden .

Als Proben diente restriktionsgespaltene DNA (s.25.) oder unverdaute DNA im Volumenbereich von 15-20 µl , der 2 µl 50 % Glycerin / 0.03 % Bromphenolblau / 0.03 % Xylencyanol zugesetzt wurden . Die Taschengröße im Gel betrug 1 x 8 x 4 mm .

Zur elektrophoretischen Charakterisierung vieler verschiedener Plasmid-DNA's aus Klonierungsexperimenten wurden kleine Horizontalgele (8 x 8 x 0.5 cm) der Zusammensetzung 0.8 % Agarose / 1 x TBE mit 15 Bahnen verwendet und nach EtBr-Anfärbung wie oben photographiert .

27.Größenbestimmung von Restriktionsfragmenten

Die Größenbestimmung von Restriktionsfragmenten zum Zwecke einer Restriktionskartierung wurde mit Hilfe der computerge-stützten Methode von Schaffer und Sederoff (48) durchgeführt . Hierzu wurde restriktionsgespaltene DNA mit Eco RI- oder Hind III-gespaltener λ cI 857-DNA als Standart gemischt (Volumen 15-20 µl) und in einem großen Horizontalgel (s.26.) 2 min mit 100 V, dann 16 hr mit 35 V in ein und derselben Bahn des Gels elektro-phoretisiert .Die Ermittlung der Mobilitäten der einzelnen Fragmente erfolgte entweder durch Vergrößerung der Gel-Photo-graphie oder ihre densitometrische Auswertung und Ausmessen mit dem Lineal der so erhaltenen Abbildungen . Die Größen der Standard-DNA Fragmente wurden nach (49) wie folgt angenommen :

λ cI 857 (Eco RI)

21 240 , 7 420 , 5 810 , 5 650 , 4 880 , 3 540 bp

λ cI 857 (Hind III)

23 150 , 9 420 , 6 560 , 4 380 , 2 320 , 2 020 , 5 60 bp

Im folgenden ist das benutzte Computerprogramm aus (48) , adaptiert an den zur Verfügung gestandenen Computer Cyber 170 aufgelistet :

```

1          PROGRAMNAME(INPUT,OUTPUT,TAPE5=INPUT,TAPE6=OUTPUT)
2          DIMENSIONWT(50),PROD(50),DWT(50),DDIST(50)
3          *,DPROD(50),C(50),D(50)
4          REALMO,L0,MWT,MDIST,MPROD
5      1000 CONTINUE
6          READ(5,1)N
7          1 FORMAT(I5)
8          IF(N.LE.0)GOTO99
9          READ(5,2)(WT(I),I=1,N)
10         2 FORMAT(8F10.0)
11         READ(5,2)(DIST(I),I=1,N)
12         SWT=0.
13         SDIST=0.
14         SPROD=0.
15         DO11I=1,N
16         SWT=SWT+WT(I)
17         SDIST=SDIST+DIST(I)
18         PROD(I)=WT(I)*DIST(I)
19         11 SPROD=SPROD+PROD(I)
20         MWT=SWT/N
21         MDIST=SDIST/N
22         MPROD=SPROD/N
23         DO12I=1,N
24         DWT(I)=WT(I)-MWT
25         DDIST(I)=DIST(I)-MDIST
26         12 DPROD(I)=PROD(I)-MPROD
27         CSSL=0.
28         CSSM=0.
29         CSCPML=0.
30         CSPMLL=0.
31         CSPMLM=0.
32         DO13I=1,N
33         CSSL=CSSL+DWT(I)**2
34         CSSM=CSSM+DDIST(I)**2
35         CSCOML=CSCPML+DWT(I)*DDIST(I)
36         CSPMLL=CSPMLL+DPROD(I)*DWT(I)
37         13 CSPMLM=CSPMLM+DPROD(I)*DDIST(I)

```

```

38      DET=CSSL*CSSM-CSCPML**2
39      MO=(CSSM*CSPMLL-CSCPML*CSPMLM)/DET
40      LO=(-CSCPML*CSPMLL+CSSL*CSPMLM)/DET
41      SC=0.
42      SSC=0.
43      DO14I=1,N
44      C(I)=(WT(I)-LO)*(DIST(I)-MO)
45      SC=SC+(C(I)-C(1))
46 14    SSC=SSC+(C(I)-C(1))
47      CBAR=SC/N+C(1)
48      SDC=SQRT((SSC-SC**2/N)/(N-1))
49      WRITE(6,101)
50 101   FORMAT("  STD LEN      DIST      PRED LEN      DEV
51      + %          C(I)")
52      SD=0.
53      SSD=0.
54      DO15I=1,N
55      PREDWT=CBAR/(DIST(I)-MO)+LO
56      WTDEV=WT(I)-PREDWT
57      PERC=100.*WTDEV/WT(I)
58      SD=SD+WTDEV
59      SSD=SSD+WTDEV**2
60 15    WRITE(6,3)WT(I),DIST(I),PREDWT,WTDEV,PERC,C(I)
61      3   FORMAT(F8.1,5F11.3)
62      SDWT=SQRT((SSD-SD**2/N)/(N-3))
63      WRITE(6,4)MO,LO,CBAR
64 4     FORMAT(" MO = ",F12.5," LO = ",F12.5," CBAR = ",F12.5)
65      WRITE(6,6)SDC,SDWT
66 6     FORMAT(" SC = ",F12.5," SD = ",F12.5)
67      READ(5,1)NU
68      IF(NU.LE.0)GOTO199
69      READ(5,2)(D(I),I=1,N)
70      DO16I=1,N
71      PREDWT=CBAR/(D(I)-MO)+LO
72 16    WRITE(6,5)D(I),PREDWT
73      5   FORMAT("  FOR A DIST OF ",F12.4," PREDICT A LEN OF ",
              [ F12.4)

```

```

74      199 GOTO1000
75      99 CONTINUE
76      END

```

Eine Erklärung der Theorie und der Zeichen ist in (48) gegeben. Als Daten müssen die Längen in Basenpaaren und die zugehörigen Wanderungsstrecken auf dem Gel für mindestens vier Standard-DNA Fragmente und die Wanderungsstrecken der in ihrer Größe zu bestimmenden Fragmente eingegeben werden. Um das Programm zu stoppen muß in der letzten Zeile des Daten-Files eine negative Zahl stehen. Im folgenden sei ein Beispiel für die Dateneingabe gegeben:

```

add
*4                                     (Anzahl der Standards)
21240.0      7420.0      5810.0      5650.0      ( bp )
  10.30      16.63      19.02      19.42      ( cm )
2                                     (Anzahl der Unbekannten)
  16.09      17.31      ( cm )
-1*

```

Für die Länge der Daten sind jeweils 10 Zeichen mit 5 Stellen vor dem Komma vorgesehen.

28. "Southern-blot"-Hybridisierung

DNA-Proben wurden nach Restriktionsspaltung in großen Horizontalgelen wie unter 26 elektrophoretisiert und nach Denaturierung die DNA aus den Gelen auf Nitrocellulose, im Wesentlichen nach den Angaben von Southern (50) und Smith (51) transferiert. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Nach Elektrophorese wurde das Agarosegel 30 min in 0.5 M NaOH / 1.5 M NaCl inkubiert, mit dest. H₂O gewaschen und 30 min mit 3 M NaCl / 0.5 M Tris-Cl pH 7.0 neutralisiert. Die DNA in den so vorbehandelten Gelen wurde bidirektional auf Nitrocellulosefilter übertragen. Dazu wurde ein Nitrocellulosefilter, der 30 min in 2 x SSC (1 x SSC = 0.15 M NaCl / 0.015 M Na-citrat pH 7.0)

benetzt worden war , auf drei Lagen Whatman 3MM Filterpapier gelegt , die mit 2 x SSC getränkt waren . Nitrocellulosefilter und Filterpapiere waren von der gleichen Größe wie das Agarosegel . Auf den Nitrocellulosefilter wurde nun das Agarosegel gelegt , darauf ein weiterer , wie oben vorbereiteter , Nitrocellulosefilter und auf diesen wiederum drei Lagen mit 2 x SSC getränktes Whatman 3MM-Papier . Es war darauf zu achten , daß beim Aufeinanderlegen keine Luftblasen eingeschlossen wurden . Dieses "Sandwich" wurde als Ganzes auf einen 4 cm dicken Stapel Papierhandtücher (24 x 23 cm , Apura R100) gelegt , und ein ebensolcher Stapel auf das "Sandwich" aufgelegt . Die gesamte Anordnung wurde mit einer Glasplatte abgedeckt und mit ca. 500 g beschwert . Nach einer Transferdauer von 1.5 hr wurden die Nitrocellulosefilter kurz in 2 x SSC geschwenkt , getrocknet und bei 80°C im Vakuum gebacken .

Zur Hybridisierung wurden die Filter in Plastiktüten , die an jeder Seite etwa 0.5 cm größer als die Filter waren , eingeschweißt und mit 15 ml 50 % Formamid(deion.) / 5 x SSPE / 5 x Denhardt's (1 x SSPE = 0.18 M NaCl / 10 mM NaPO₄ pH 7.7 / 1 mM EDTA ; 1 x Denhardt's = 0.02 % Ficoll 400 / 0.02 % Polyvinylpyrrolidon / 0.02 % BSA) für 4 hr bei 42°C prähybridisiert . Es war darauf zu achten , daß beim Einschweißen möglichst wenig Luftblasen eingeschlossen wurden . Hybridisiert wurde , indem die Prähybridisierungslösung durch 15 ml derselben Lösung ersetzt wurde , der nach dem Einfüllen in den Plastikbeutel 3×10^6 Cpm ³²P-markierte denaturierte DNA (1 min 100°C , auf Eis abschrecken) als Hybridisierungsprobe zugesetzt wurden . Nach Zuschweißen des Beutels wurde dieser zwischen zwei Glasplatten gelegt , um Luftblasen vom Filter fernzuhalten , und 12 hr bei 42°C inkubiert . Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entfernt , der Filter 1 x 10 min mit 200 ml 2 x SSPE / 0.1 % SDS bei RT , 1 x 10 min mit 200 ml 0.2 x SSPE / 0.1 % SDS bei RT und 1 x 10 min mit 200 ml 2 x SSPE / 0.1 % SDS bei 42°C gewaschen . Nach Trocknen des Filters wurde ein Röntgenfilm (Fuji RX 100) unter Anwendung von Verstärkungsfolien (Du Pont Cronex) 2-5 Tage bei -70°C exponiert .

29. Präparative Isolierung von mtDNA-Restriktionsfragmenten

10 µg restriktionsgespaltene mtDNA wurden in einem präparativen Horizontalgel (24 x 3 x 1 cm) der Zusammensetzung 0.5 % Agarose / 1 x TBE (s.26) 16 hr bei 35 V in 1 x TBE elektrophoretisiert . Im Anschluß an die EtBr-Färbung wurden die gewünschten Banden unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht herausgeschnitten und die in den Gelstückchen enthaltene DNA mit Hilfe eines Isco Sample Concentrator's (Modell 1750) nach den Angaben von Zassenhaus et.al. (52) elektroeluiert . Dabei fand das dort zitierte Puffersystem II Anwendung .

30. "Nick-translation" von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Zur ^{32}P -markierung von DNA wurden 0.5 µg DNA in 50 µl Gesamtvolumen von 20 mM Tris-Cl pH 7.5 / 10 mM MgCl / 20 mM Mercaptoethanol / 0.2 % BSA / 50 µM dTTP / 50 µM dCTP / 50 µM dGTP mit 0.5 ng DNase I 2 min auf Eis inkubiert . Danach wurden 10 µCi ^{32}P -dATP und 2 U DNA-Polymerase I zugegeben und 2 hr bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 65°C inkubiert und danach die markierte DNA durch Gelchromatographie an einer mit 10 mM Tris-Cl pH 7.5 / 1 mM EDTA äquilibrierten Sepharose Cl 6B 200 Säule (8 x 0.6 cm) überschüssigen Nukleotiden und Salzen gereinigt . Zum Einsatz in Hybridisierungsexperimenten wurde diese DNA-Lösung durch 1 minütiges Erhitzen auf 100°C und anschließendes Abschrecken auf Eis , denaturiert .

31. Entfernung der 5'-PO₄-Gruppen von DNA-Fragmenten

Durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurden die 5'-PO₄-Gruppen von den Enden linearisierter Plasmide entfernt. Hierzu wurde 1 µg restriktionsgeschnittene Plasmid-DNA in 50 mM Tris Cl pH 8.0 und einem Gesamtvolumen von 200 µl mit 1 U Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm 1 hr bei 45°C inkubiert. Nach 10 min Erhitzen auf 65°C wurde 3 x mit je 1 Vol. Phenol

(gesättigt mit 10 mM Tris-Cl pH 7.0 / 1 mM EDTA) und 2 x mit je 1 Vol. Ether extrahiert . Nach Zugabe von 0.1 Vol. 3 M Naac pH 5.3 wurde mit 2.5 Vol. Ethanol (-20°C) gefällt , in fl.N₂ eingefroren und zentrifugiert (10 000 x g, 10 min, 4°C) . Nach Trocknen des Niederschlags im Vakuum , wurde er in bidest.H₂O aufgenommen . Für die Anwendung in Klonierungsexperimenten wurde die Phosphatase-behandelte Vektor-DNA zusammen mit der zu klonierenden DNA gefällt .

32.Ligieren von DNA-Restriktionsfragmenten

Ein Gemisch der zu ligierenden DNA-Fragmente (insgesamt 1 µg DNA) in 8 µl bidest. H₂O wurde 10 min bei 65°C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt . Dann wurde eine Konzentration von 30 mM Tris-Cl pH 8.0 / 7 mM MgCl / 10 mM DTT / 0.2 mM ATP / 50 µg/ml BSA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt und das Ligationsgemisch in Ggw. von 10 U T₄-Ligase 14 hr bei 16°C inkubiert . Nach Beendigung der Ligation wurde das Gemisch sofort zur Transformation eingesetzt .

33.Transformation von E.coli K12 Stämmen

Die Transformation der E.coli-Stämme RR 1 , SK 2881 und JM103 wurde nach der Vorschrift von Kushner et.al.(53) durchgeführt . Abweichend von dieser Vorschrift wurden die transformierten E.coli-Zellen nach der Regeneration bei 37°C zentrifugiert (6 000 x g, 10 min, RT) , in 2.0 ml LB-Medium aufgenommen und in 0.2 ml Portionen auf Selektiv-Medium ausplattiert .

34.Harnstoff/Agarose-Gelelektrophorese von mtRNA

mtRNA wurde in denaturierenden Harnstoff/Agarose-Gelen (Vertikal-Flachgele , 15 x 14 x 0.3 cm) nach den Angaben von Locker et.al. (54) elektrophoretisiert . Die Gele hatten eine

Zusammensetzung von 1.2 % Agarose / 5 M Harnstoff / 15 mM Jodessigsäure / 1 x Laufpuffer. Der Laufpuffer bestand aus 40 mM Tris-ac pH 7.4 / 20 mM Naac / 33 mM Essigsäure / 1 mM EDTA. Die Proben wurden entweder zu 5 M Harnstoff / 25 % Saccharose / 15 mM Jodessigsäure / 1 x Laufpuffer / 0.05 % Bromphenolblau oder zu 50 % Formamid (deion.) / 2.2 M Formaldehyd(deion.) / 1 x Laufpuffer / 0.05 % Bromphenolblau aufgenommen, 5 min bei 60°C inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Es wurden pro Tasche bis zu 15 µl Gesamtvolumen aufgetragen und etwa 3-4 hr mit 100 V elektrophoretisiert. Nach 20 min Färben mit einer wässrigen EtBr-Lösung (1 µg/ml) und anschließendem Entfärben in deion.H₂O (20 min) – beide Schritte bei 4°C – wurde das Gel bei Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert (Polaroid MP 4, Film 665).

35. Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophorese von mtRNA

Die Elektrophorese von mtRNA in denaturierenden Formaldehyd/Agarose-Gelen (Vertikal-Flachgele, 15 x 14 x 0.3 cm) wurde nach den Angaben von Seed (86) durchgeführt. Die Gele wiesen eine Zusammensetzung von 0.8 % Agarose / 2.2 M Formaldehyd (deion.) / 1 x Laufpuffer auf. Der Laufpuffer bestand aus 20 mM Mops pH 7.0 / 5 mM Naac / 1 mM EDTA. Die RNA-Proben wurden in 50 % Formamid (deion.) / 2.2 M Formaldehyd (deion.) / 1 x Laufpuffer 5 min bei 60°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Nach Zusatz von 0.1 Vol. 0.3 % Bromphenolblau / 0.3 % Xylencyanol wurden bis zu 10 µl pro Tasche auf das Gel aufgetragen und etwa 3 hr mit 100 V elektrophoretisiert.

36. "Northern-blot"-Hybridisierung

Zum Transfer von RNA auf Nitrocellulosefilter wurden routinemäßig nur Formaldehyd/Agarose-Gele herangezogen. Diese wurden nach Elektrophorese (s.o.) 30 min in 20 x SSC (s.28) inkubiert. Zwei Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll BA 85) von derselben Größe wie das zu "blottende" Gel wurden 30 min in 2 x SSC inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die RNA aus

dem Gel bidirektional auf zwei Nitrocellulosefilter übertragen. Hierzu wurde der erste Nitrocellulosefilter auf drei ebenso große, übereinander liegende Blätter Whatman 3MM Filterpapier gelegt, die mit 2x SSC getränkt waren. Darauf wurden in folgender Reihenfolge das Agarosegel, der zweite Nitrocellulosefilter und weitere drei Blatt Whatman 3MM (mit 2x SSC getränkt) gelegt. Es war darauf zu achten, daß keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Dieses "Sandwich" wurde auf einen 4 cm hohen Stapel Papierhandtücher (24 x 23 cm, Apura R 100) übertragen, und darauf ein zweiter, gleichartiger Stapel gelegt. Beschwert wurde der fertige Stapel mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 500 g. Nach einer Transferdauer von 1.5 hr wurden die Nitrocellulosefilter kurz in 2x SSC geschwenkt und 4 hr bei 80°C im Vakuum gebacken.

Prähybridisiert wurde ein Nitrocellulosefilter eingeschweißt in einen Plastikbeutel, der etwas größer als der Filter war, für 4 hr mit 0.05 ml/cm^2 Filterfläche einer Lösung von 5x SSC / 5x Denhardt's (s.28) / 0.1 % SDS / 50 % Formamid (deion.) / 0.5 mg/ml ctDNA bei 42°C. Zur Hybridisierung wurde diese Lösung durch frische Lösung derselben Art ersetzt, der $3 \times 10^6 \text{ Cpm } ^{32}\text{P}$ -markierter denaturierter DNA-Probe (1 min 100°C, auf Eis abgeschreckt) zugesetzt waren. Um eventuelle Luftblasen zu verdrängen wurde der wieder zugeschweißte Plastikbeutel zwischen zwei Glasplatten gelegt. Die Hybridisierung erfolgte während 12 hr bei 42°C. Nach beendeter Hybridisierung wurde der Filter wie folgt gewaschen: 2x 5 min in 200 ml 2x SSC / 0.1 % SDS bei RT; 2x 15 min in 200 ml 0.2x SSC / 0.1 % SDS bei 42°C; 2x 15 min in 200 ml 2x SSC / 0.1 % SDS bei 42°C. Nach dem Trocknen des Filters wurde ein Röntgenfilm (Fuji RX 100) unter Verwendung von Verstärkerfolien (Du Pont Cronex) 1-4 Tage mit dem radioaktiven Filter bei -70°C exponiert.

III. Ergebnisse

A. Enzymologische Untersuchungen an pet-ts Mutanten zum Nachweis genspezifischer funktioneller Defekte.

Ein erster Schritt zur phänotypischen Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Laktat-negativen pet-ts Mutanten sollte in der enzymchemischen Charakterisierung der in ihnen enthaltenen Enzyme von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung bestehen. Dabei sollten, in Kombination mit der zuvor durchgeführten Komplementationsanalyse, Gen-spezifische Enzymdefekte ermittelt und damit die Funktion der verschiedenen pet-Gene charakterisiert werden. Vor dieser Versuchsreihe sollten allerdings noch durch geeignete Vorversuche eine Reihe von experimentellen Bedingungen optimiert werden. Diese Vorversuche werden im folgenden zunächst beschrieben.

1. Einfluß von Hemmstoffen der mitochondriellen Atmungskette auf Wachstum und Enzymaktivitäten in Wildtyp-Zellen und in Protease A- bzw. B-defekten Mutanten.

In den Mitochondrien Kern-kodierter pet-ts Mutanten sind prinzipiell zwei Arten von funktionellen Defekten vorstellbar: einmal kann ein phänotypischer Defekt die direkte Folge des Mutationsereignisses sein. Zum Beispiel würde man den Verlust der Aktivität eines Atmungskettenenzym als Folge der Mutation einer seiner Untereinheiten erwarten. Zum anderen könnten aber auch experimentell festgestellte Defekte die sekundäre Folge ursächlich anderer Defekte sein. Dies wäre zum Beispiel der Fall, wenn die mutationsbedingte Schädigung eines Proteins 1 zum Ausfall eines Proteins 2, welches mit dem ersten in

Protein-Protein-Wechselwirkung steht, führen würde. Ebenso wäre es denkbar, daß ein funktionierender Elektronentransport und damit eine ausreichend hohe zelluläre ATP-Konzentration die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung einer kritischen "steady-state"-Konzentration und damit Aktivität bestimmter Atmungsketten-Komponenten darstellt. Es besteht die Möglichkeit, mit Hilfe von Hemmstoffen der Atmungskette in Wildtypzellen den Effekt bestimmter Mutationen zu simulieren, und damit die oben angesprochenen Fragen zu untersuchen. Entsprechende Versuche wurden an Wildtyp-Zellen (SC 167) mit Cyanid als Cytochromoxidase-Hemmstoff, mit Oligomycin als spezifischem Hemmstoff der ATPase und mit Cycloheximid, einem Hemmstoff der cytoplasmatischen Proteinsynthese unter normalen Kulturbedingungen und (ohne Zusatz von Hemmstoffen) unter Hungerbedingungen (d.h. ohne zugesetzte Kohlenstoffquelle) durchgeführt. Schließlich wurden dieselben Versuche auch noch mit zwei Proteinase-defekten Mutanten (pra^- und prb^-) wiederholt, um dabei evtl. wirksame proteolytische Prozesse gegebenenfalls auszuschalten.

In Fig. 4 sind Wachstumsraten und die Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung für den Stamm SC 167 unter den verschiedenen angegebenen Kulturbedingungen graphisch dargestellt.

Nach Zugabe von Cycloheximid hörte erwartungsgemäß das Wachstum sofort auf. Die Cytochromoxidase-Aktivität war schon 24 hr später nicht mehr nachweisbar. Die anderen Enzymaktivitäten waren nach 48 hr auf unter 25 % der Ausgangswerte abgesunken. Diese Befunde sprechen für entsprechend hohe Umsatzraten der untersuchten Enzyme, bedingt durch die Wirksamkeit proteolytischer Aktivitäten in den Mitochondrien. Diese kommen besonders dann zum tragen, wenn, wie etwa in Ggw. des Hemmstoffs, kein neues Protein mehr synthetisiert wird.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Zugabe von Cyanid zur Kultur erhalten: eine sofortige Inaktivierung der Cytochromoxidase und ein Ende des Zellwachstums waren die Folge. Auch

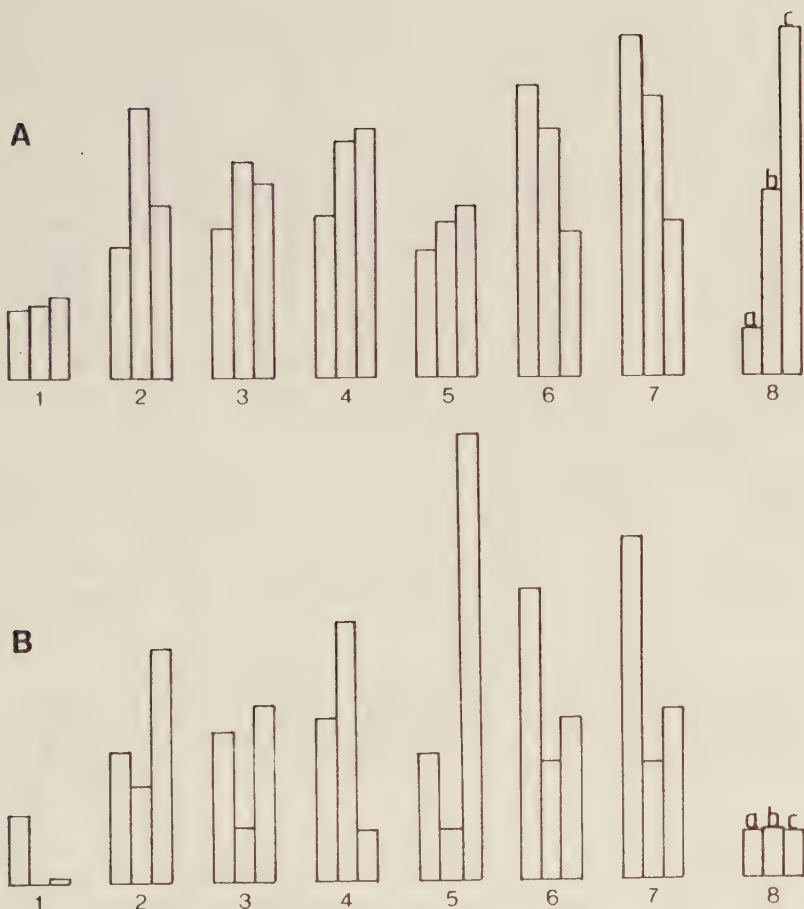
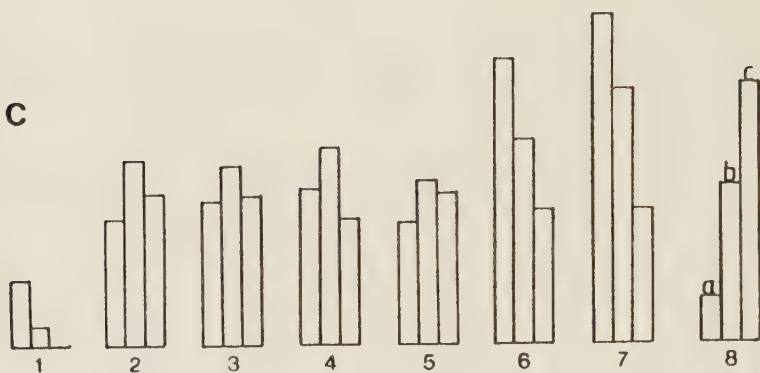


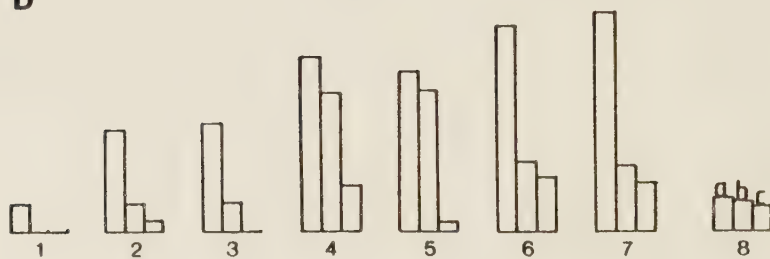
Fig.4 Wachstumsraten und relative Aktivitäten von Atmungskettenphosphorylierungs-Enzymen des Wildtyps SC 167 bei Anzucht in Ggw. spezifischer Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung und cytoplasmatischen Proteinsynthese.

Wildtyp SC 167 wurde in Laktat-Medium bei 36°C in Ggw. von 1 mM KCN (B), 0.1 mM Oligomycin (C), 1 mM Cycloheximid (D) sowie frei von Inhibitoren (A) und ohne Zusatz von Laktat (E) gezüchtet, nach 0 (a), 24 (b) und 48 (c) hr Wachstumsraten bestimmt und geerntet. An isolierten Mitochondrien dieser Proben wurden die Aktivitäten von Cytochromoxidase (1), NADH:Cyt. c-Reduktase (2), Succ.:Cyt. c-Reduktase (3), NADH:Q-Reduktase (4), Succ.-Dehydrogenase (5) sowie Gesamt- (6) und oligomycinempfindlicher (7) ATPase gemessen. Bzgl. Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

C



D



E

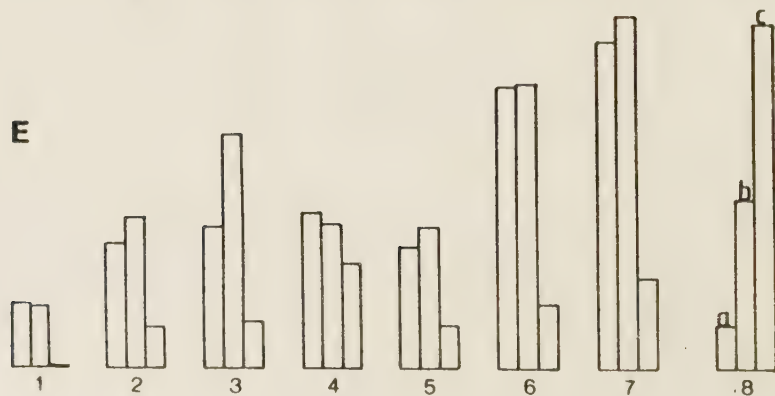


Fig.4 (Fortsetzung)

die Aktivitäten der Enzyme NADH:Cytochrom c-Oxidoreduktase , Succinat:Cytochrom c-Oxidoreduktase , Succinat-Dehydrogenase und ATPase sanken bis auf 30 % der Ausgangswerte ab . Allerdings wurde nach 48 hr wieder eine geringe Cytochromoxidase-Aktivität und auch ein Anstieg der anderen Enzymaktivitäten mit Ausnahme der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase , beobachtet . Dies könnte bedeuten , daß die zugesetzte Menge Cyanid nicht ausreichend war , und zu diesem Zeitpunkt abgebaut oder resorbiert war .

Der Zusatz von Oligomycin führte lediglich im Falle der Cytochromoxidase zu einem vollständigen und im Fall der ATPase zu einem 50 %igen Abfall bezogen auf die Ausgangsaktivitäten . Dies könnte bedeuten , vor allem im Hinblick auf die nur wenig beeinträchtigte Zellteilung , daß Oligomycin unter den angewandten Bedingungen von den intakten Hefezellen nur unvollkommen aufgenommen wurde . Allerdings bleibt offen , wie in Laktat-Medium Zellteilung ohne Cytochromoxidase-Aktivität möglich war .

In Laktat-freiem Medium schließlich wurde , entsprechend der Laktat-haltigen Kultur , ein Abfall der Einzelaktivitäten auf meist weniger als 30 % im Vergleich zur Ausgangsaktivität beobachtet .

Fig.5 und 6 zeigen – mit Ausnahme des Cycloheximid-Zusatzes – die Ergebnisse derselben Versuchsanordnungen mit den Proteinase A- bzw. B-defekten Mutanten H6I-2 11A und HP232-2B . Ein Vergleich der erhaltenen Daten mit den in Fig.4 dargestellten SC 167 -Werten zeigt zwar gewisse quantitative Unterschiede , deren Bedeutung aber wahrscheinlich nicht überinterpretiert werden sollte .

Insgesamt haben die Versuche gezeigt , daß sowohl eine chemisch induzierte Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese wie auch eine Hemmung einzelner Komponenten der Atmungs-

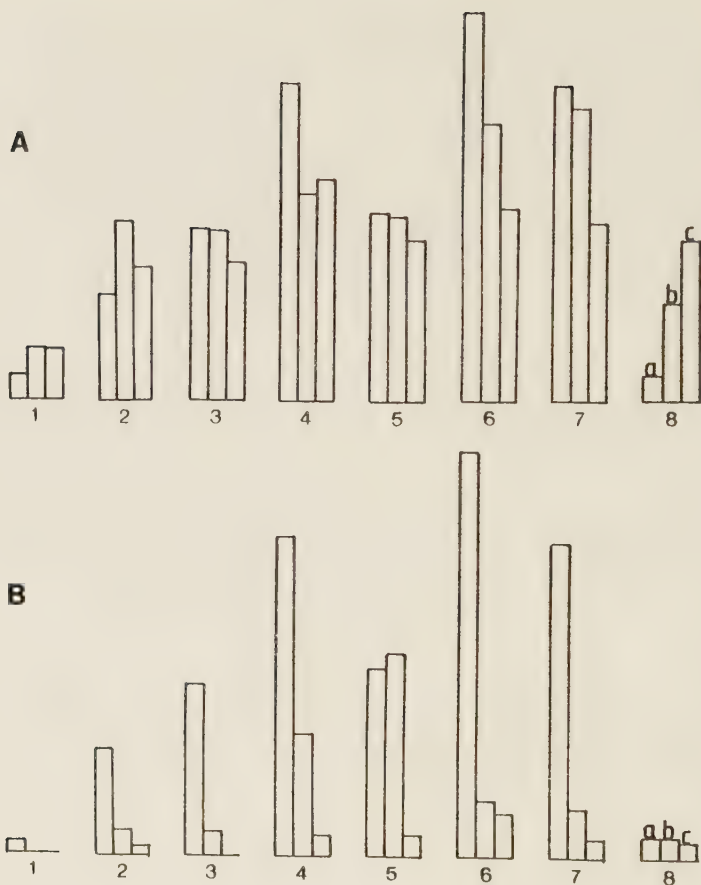


Fig. 5 Wachstumsraten und relative Aktivitäten von Atmungskettenphosphorylierungs-Enzymen einer Proteinase B defekten Mutante (HP 232-2B) bei Anzucht in Ggw.spezifischer Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung.

Die Mutante HP 232-2B wurde in Laktat-Medium bei 36°C in Ggw. von 1 mM KCN (B), 0.1 mM Oligomycin (C) sowie frei von Inhibitoren (A) und ohne Zusatz von Laktat (D) gezüchtet, nach 0 (a), 24 (b) und 48 (c) hr Wachstumsraten (8) bestimmt und geerntet. An gereinigten Mitochondrien wurden die Enzymaktivitäten der Atmungskettenphosphorylierung (vgl. Legende Fig. 4) gemessen. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

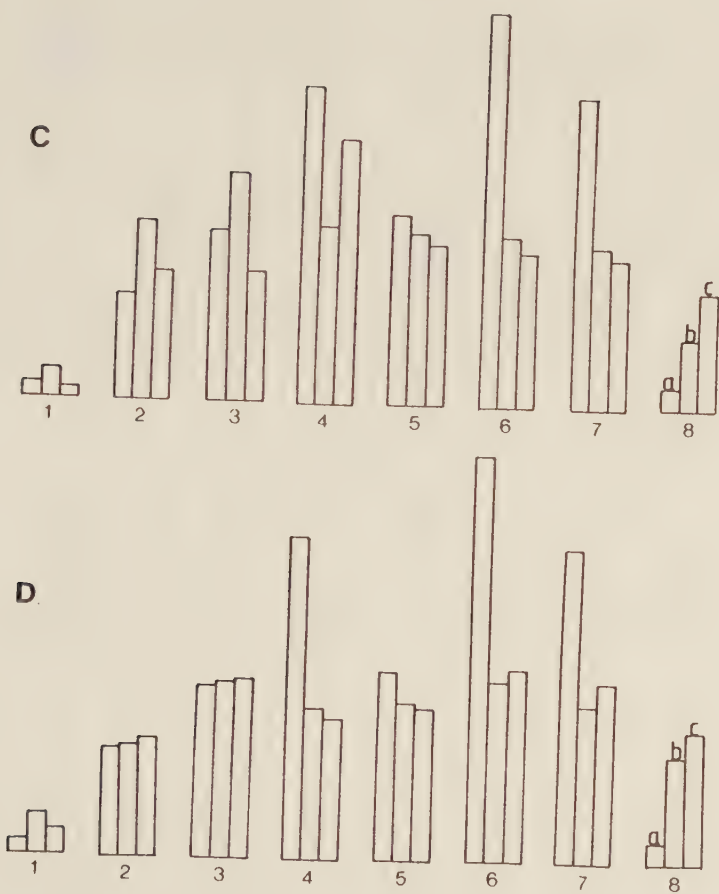


Fig.5 (Fortsetzung)

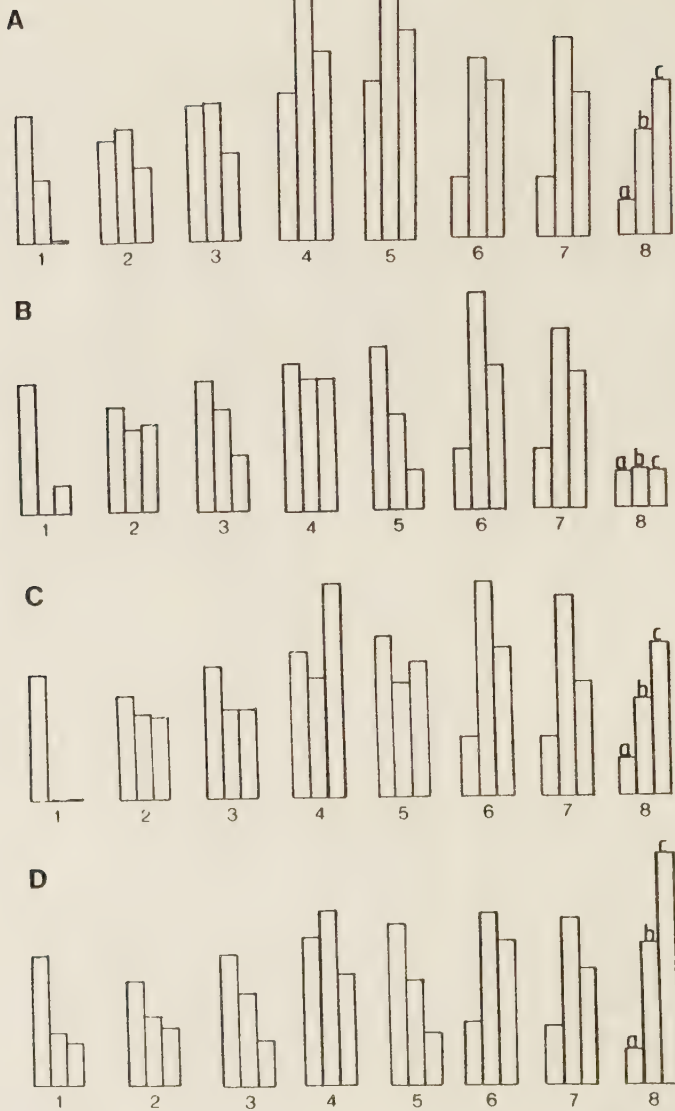


Fig.6 Wachstumsraten und relative Aktivitäten von Atmungskettenphosphorylierungs-Enzymen einer Proteinase A defekten Mutante (H6 I-211A) bei Anzucht in Ggw.spezifischer Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung.
 Erklärungen siehe Legende Fig.5.

kette innerhalb kurzer Zeit zu einschneidenden Aktivitätseinbußen der meisten Atmungsketten-Enzyme führten. In allen Fällen hatte sich die Cytochromoxidase als vergleichsweise besonders empfindliches Teilenzym der Atmungskette herausgestellt. Demnach war zu erwarten, daß auch mutationsbedingte Inaktivierungen derselben Teilenzyme zu ähnlich pleiotropen Defekten führen würden. Um eine mögliche Ursache für diese Pleiotropie auszuschließen, wurde weiter unten versucht, durch Verwendung anderer Kohlenstoffquellen, wie Glukose oder Galaktose, zu gewährleisten, daß die Mutanten selbst unter nicht-permissiven Bedingungen noch wenigstens zur Substratketten-Phosphorylierung und damit zu einem, wenn auch schwachen, Wachstum in der Lage waren.

2. Abhängigkeit der Aktivität mitochondrieller Enzyme in Wildtyp-Mitochondrien von der An- zucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Zur Bestimmung spezifischer Mutanten-Defekte ist es gerade beim Arbeiten mit temperatursensitiven Mutanten wichtig, eine Standardisierung vor allem der Inkubationsdauer bei nicht-permissiver Temperatur und der Art der verwendeten Kohlenstoffquelle durchzuführen. Es ist bekannt, daß Aktivitäten und Mengen bestimmter Enzyme im Zellzyklus und damit auch im zeitlichen Verlauf des Wachstums einer Hefezell-Kultur Schwankungen unterworfen sind. Ebenso ist eine Abhängigkeit gerade der Atmungskettenenzym-Aktivitäten von der Kohlenstoffquelle bekannt ("Glukoserepression") (88). Bei der Bestimmung von mutationsbedingten Enzymdefekten müssen die Messungen daher zu einem optimalen Zeitpunkt der Wachstumsphase und unter Verwendung der am besten geeigneten Kohlenstoffquelle durchgeführt werden. Diesbezügliche Vorversuche wurden mit dem Laktat-positiven S. cerevisiae-Stamm SC 167, aus dem auch alle pet-Mutanten hergestellt worden waren, durchgeführt.

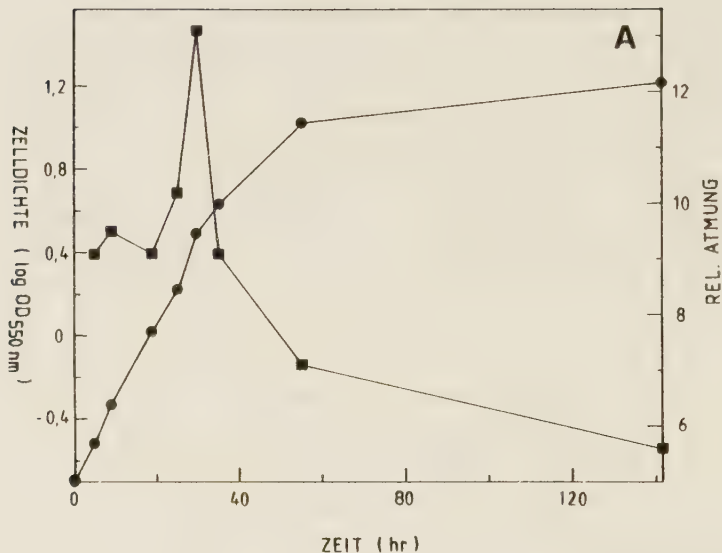


Fig.7 Veränderungen der Enzymaktivitäten der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in Wildtyp Hefe-Mitochondrien im Verlauf der Anzucht in 22°C Laktat-Medium.

Wildtyp (SC 167) wurde bei 22°C in Laktat-Medium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der Kultur entnommen, deren Atmungsraten (■) und Zelldichten (●) bestimmt (Fig. 7A) und aus den geernteten Zellen Submitochondrielle Partikel isoliert. An diesen wurden die Aktivitäten der Enzyme Cytochromoxidase (◼), NADH:Cyt. c-Reduktase (●), Succ.:Cyt. c-Reduktase (▽) (Fig. 7B), sowie NADH:Q-Reduktase (▼), Succ.-Dehydrogenase (◻), Gesamt- (◆) und oligomycinempfindliche (◇) ATPase (Fig. 7C) bestimmt. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

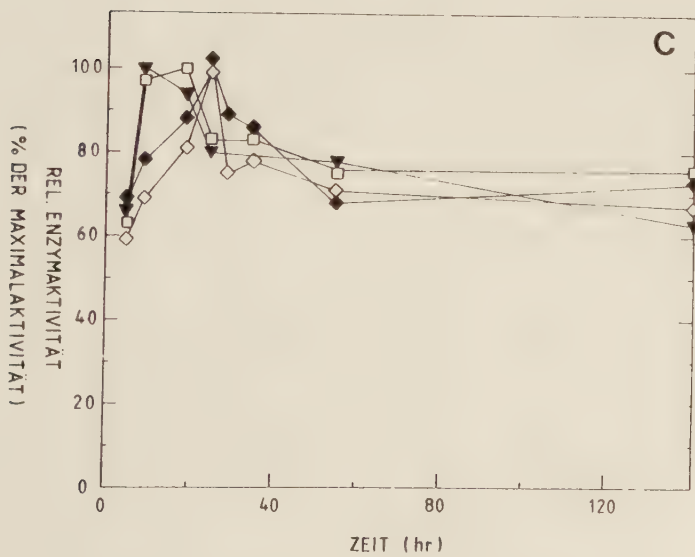
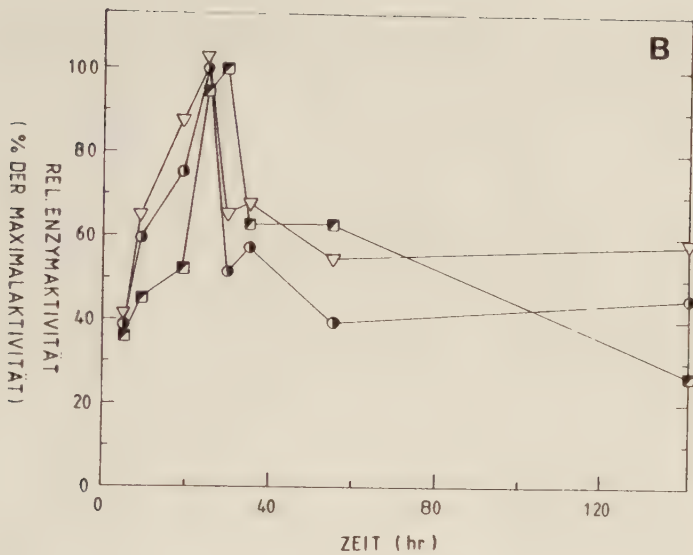


Fig.7 (Fortsetzung)

Untersucht wurde dieser Stamm hinsichtlich seiner Atmungs- und Atmungskettenenzym-Aktivitäten in verschiedenen Wachstumsphasen, jeweils mit Laktat, Glukose, Saccharose, oder Galaktose bei nicht-permissiver (36°C) sowie – im Falle von Laktat – auch permissiver Temperatur (22°C). In Fig.7 sind die erhaltenen Daten für die Anzucht auf Laktat-Medium bei permissiver Temperatur wiedergegeben. Man erkennt für die Atmung und die Enzyme Cytochromoxidase, NADH: Cytochrom c-Oxidoreduktase und Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase ein scharfes Maximum zu Beginn des zweiten Drittels der log-Phase. Die restlichen Enzyme zeigen ein weniger ausgeprägtes Maximum in diesem Bereich. Alle Enzymaktivitäten nehmen aber bei Erreichen der stationären Phase wieder ab. Die Anzucht auf Laktat-Medium bei der für die Mutanten nicht-permissiven Temperatur von 36°C führt, mit Ausnahme der Cytochromoxidase-Aktivität, zu einem ähnlichen Ergebnis. Dies ist, zusammen mit den Ergebnissen nach Anzucht auf 1% Galaktose, 1% Glukose bzw. 1% Saccharose jeweils bei 36°C, in Fig.8 dargestellt. Im Falle der Anzucht auf Laktat bei 36°C fällt die Aktivität der Cytochromoxidase sofort nach Temperaturerhöhung auf ein Drittel des Ausgangswertes ab. In ähnlichem Ausmaß ist dies auch in Glukose- oder Saccharose-haltigen Medien der Fall. Bei Anzucht auf 1% Galaktose bleibt jedoch die Cytochromoxidase-Aktivität noch während eines Zeitraums von 50 hr nach der Temperaturerhöhung auf 36°C fast vollständig erhalten. Die Aktivitäten der anderen Enzyme sinken im Galaktose-Medium während der ersten 50 hr ebenfalls nur wenig ab. Noch günstigere Werte werden hier bei Wildtyp-Kulturen mit Laktat als Kohlenstoffquelle erhalten, wo innerhalb der ersten 50 hr nach Temperaturerhöhung sogar noch eine Zunahme der oben genannten Enzymaktivitäten gefunden wurde (vgl. Fig.8A). Auch in 1% Saccharose-haltigem Medium werden diese Enzymaktivitäten über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten. Bei Anzucht auf Glukose-haltigen Medien dagegen sinken die Enzymaktivitäten innerhalb von 24 hr auf unter 50% der Ausgangsaktivitäten ab (vgl. Fig.8C). Vergleicht man die Entwicklung der Atmungsraten von Wildtyp-Zellen nach Temperaturerhöhung von 22° auf 36°C in Medien mit unterschiedlichen

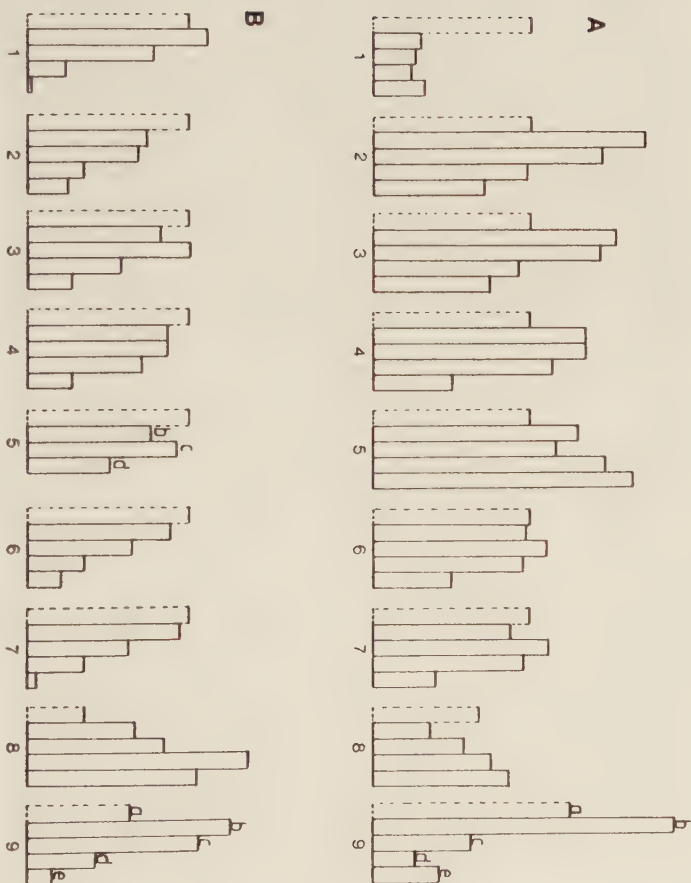
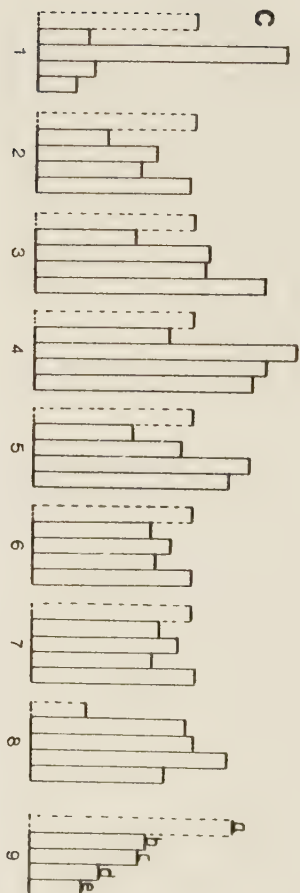


Fig. 8 Wachstumsverhalten, Atmungsraten und Enzymaktivitäten der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung von Wildtyp-Hefe in Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Wildtyp-Hefe (SC 167) wurde bei 36°C in 0.3% Laktat-Medium (A), 1% Galaktose-Medium (B), 1% Glukose-Medium (C) und 1% Saccharose-Medium (D) kultiviert. Nach 0 (a), 25 (b), 50 (c), 75 (d) und 100 (e) Stunden wurden Proben entnommen, Zelldichten (9) und Atmungsraten (8) bestimmt, Submitochondrielle Partikel isoliert und an diesen die Aktivitäten von Cytochromoxidase (1), NADH:Cyt.c-Reduktase, (2), Succ.:Cyt.c-Reduktase (3), NADH:Q-Reduktase (4), Succ.-Dehydrogenase (5), Gesamt- (6) und oligo-



D

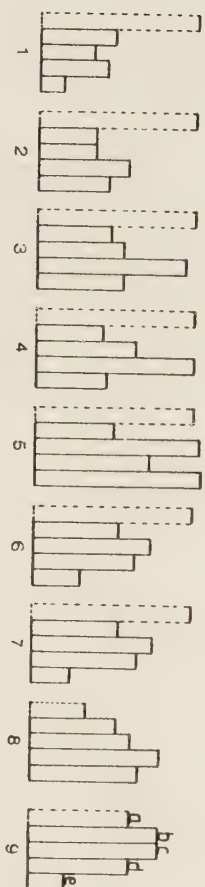


Fig. 8 (Fortsetzung)
mycinsensitiver (?) ATPase gemessen. Zur Darstellung der relativen Aktivitäten wurden die Ausgangsaktivitäten (0 hr -----) gleich 100 % gesetzt.

Kohlenstoffquellen , so findet man bei Verwendung von Galaktose um 20 - 70 % höhere Werte als mit den anderen Kohlenstoffquellen .

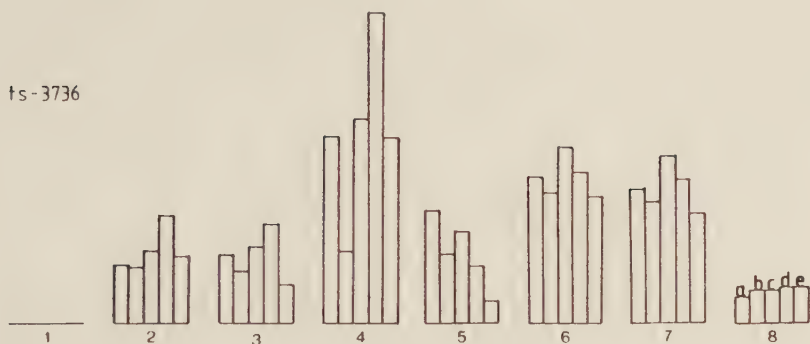
Die genannten Ergebnisse lassen Galaktose als die am besten geeignete Kohlenstoffquelle für die vorgesehenen Untersuchungen erscheinen . Es ist sehr wahrscheinlich , daß dies mit der im Vergleich zu Glukose bedeutend geringeren Neigung zur Ausprägung von Katabolitrepersions-Effekten zusammenhängt . In Laktat-Medium werden zwar , mit Ausnahme der Cytochromoxidase , ebenfalls hohe Enzymaktivitäten erhalten , doch scheint Laktat im Hinblick auf die geplanten Untersuchungen an pet-ts Mutanten weniger geeignet , da hier ein Defekt in der Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff zu einem raschen Absterben der Hefezellen führen , und dabei möglicherweise unerwünschte Nebeneffekte auslösen würde .

3. Inaktivierungskinetiken einiger ausgesuchter pet-ts Mutanten.

Aus den oben gezeigten Daten wurde geschlossen, daß es prinzipiell möglich sein sollte, zumindest eine qualitativ auffällige Veränderung im Enzymaktivitäts-Muster von atmungsdefekten temperatursensitiven Hefemutanten zu erkennen, wenn man das Wachstum bei nicht-permissiver Temperatur in 1% Galaktose-Medium durchführt und auf einen Zeitraum zwischen 24 und 48 hr nach Temperaturerhöhung beschränkt. Ob sich diese an Wildtyp-Kulturen gewonnenen Vorstellungen durch Versuche mit pet-ts Mutanten bestätigen lassen, sollte zunächst durch die Aufnahme von Inaktivierungskinetiken an acht pet-ts Mutanten überprüft werden. Insbesondere sollte dabei auch geklärt werden, ob ein zu einem späteren Zeitpunkt pleiotroper Phänotyp sich zu früheren Zeitpunkten als spezifischer Defekt zu erkennen gibt. Weiterhin war zu klären, ob sich eine Zeitspanne für die Inkubation der pet-ts Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur angeben läßt, innerhalb derer die meisten pet-ts Mutanten ihren Phänotyp, möglichst spezifisch und nicht pleiotrop, ausprägen.

Solche Inaktivierungskinetiken sind in Fig.9 gezeigt. Sie machen deutlich, daß im allgemeinen nach spätestens 48 hr Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur deutliche Effekte in Form einer verringerten Aktivität eines oder mehrerer Enzyme der Atmungskette beobachtet werden. Diese Effekte heben sich gewöhnlich von unspezifischen Aktivitätsverminderungen anderer Enzyme deutlich ab (z.B. ts-1475 und ts-2081). Ein besonders klares Beispiel hierfür ist die Mutante ts-3418, bei der nach 48 hr die Cytochromoxidase-Aktivität völlig verschwunden ist, die Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase und die Succinat-Dehydrogenase in ihrer Aktivität stark verringert sind, während alle anderen Enzymaktivitäten nahezu Ausgangswerte aufweisen. Aber selbst in einem so wenig deutlichen Fall wie er sich bei der Mutante ts-3983 darstellt, ist ein Defektmuster ähn-

ts-3736



ts-3757

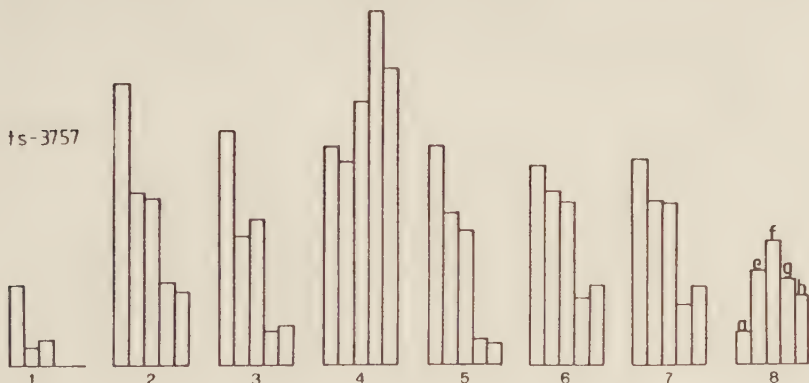


Fig.9 Inaktivierungskinetiken der Atmungskettenenzyme von ausgewählten pet-ts Mutanten bei Kultivation unter nicht-permissiven Bedingungen.

pet-ts Mutanten wurden bei 36°C in 1% Galaktose-Medium 0 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 24 (e), 48 (f), 72 (g) und 96 (h) Stunden kultiviert. Zu diesen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, Zelldichten (8) bestimmt, Submitochondrielle Partikel isoliert und an ihnen die Aktivitäten der Enzyme Cytochromoxidase (1), NADH:Cyt.c-Reduktase (2), Succ.:Cyt.c-Reduktase (3), NADH:Q-Reduktase (4), Succ.-Dehydrogenase (5) und Gesamt- (6) sowie oligomycinsensitive (7) ATPase gemessen. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

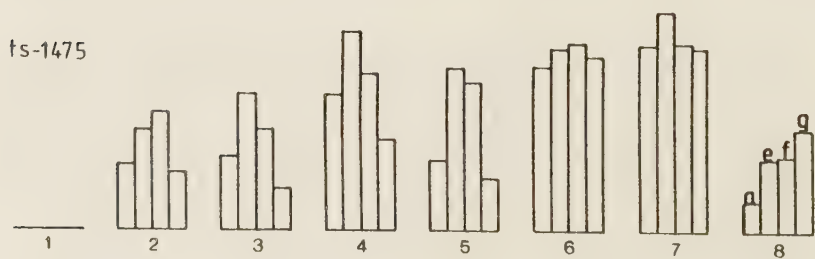
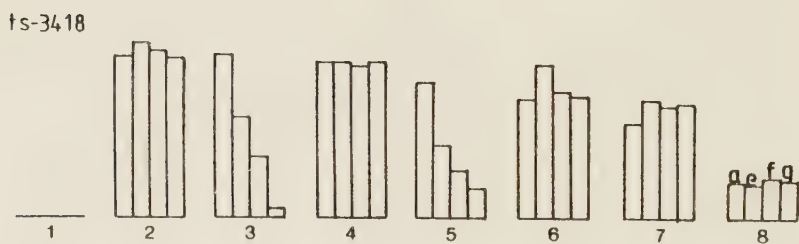
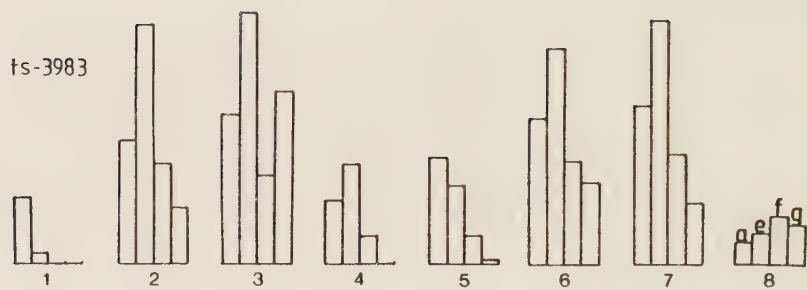
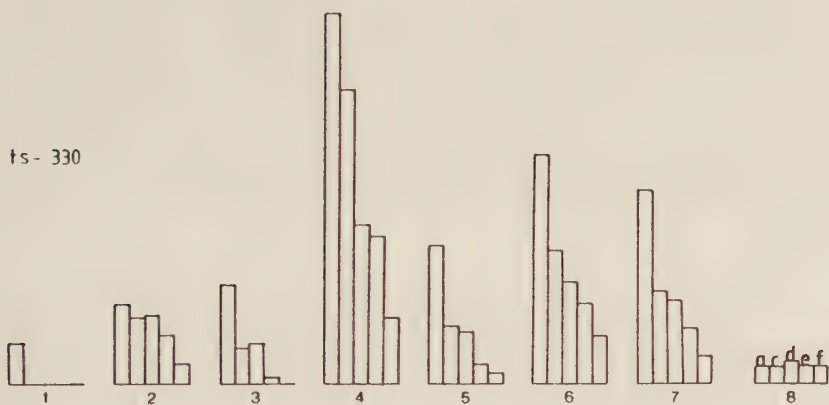
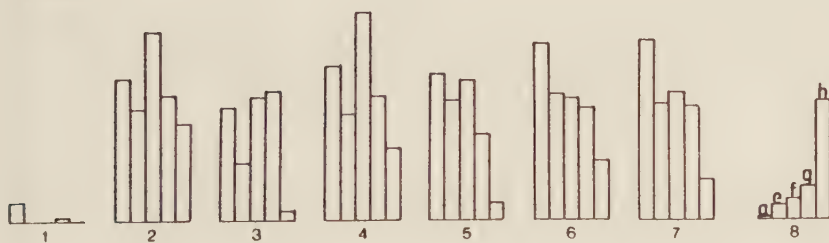


Fig.9 (Fortsetzung)

ts-330



ts-2081



ts-4094

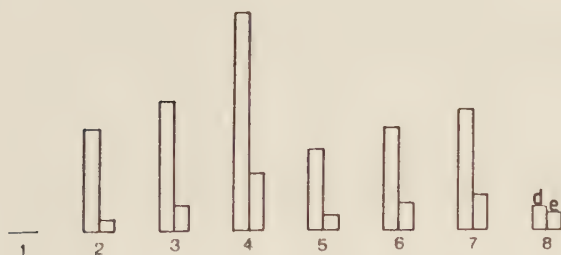


Fig.9 (Fortsetzung)

licher Art , zumindest qualitativ , ebenfalls noch auszumachen . Auf der anderen Seite zeigt die Mutante ts-330 , die nach 48 hr ein pleiotropes Defektmuster aufweist , eine kontinuierliche Abnahme aller Enzymaktivitäten mit Ausnahme der Cytochromoxidase-Aktivität , die sofort verschwindet . Hier ist es schwierig zu entscheiden , ob die Pleiotropie eine Folge des Ausfalls der Cytochromoxidase ist oder ob ein allgemeiner pleiotroper Effekt vorliegt .

Insgesamt zeigen die Versuche , daß es möglich sein sollte , die Enzymdefekt-Muster der Mehrzahl der zu untersuchenden pet-ts Mutanten anhand von Enzymaktivitäts-Messungen zu einem Zeitpunkt zwischen 24 und 48 hr nach Überführen auf nicht-permissive Temperatur in Galaktose-Medium , zu erkennen .

4. Suche nach spezifischen Enzymdefekten bei pet-ts Mutanten aus 180 verschiedenen Komplementationsgruppen.

Für ein routinemäßiges Durchtesten einer größeren Zahl von pet-ts Mutanten wurden nach den oben geschilderten Vorversuchen , die Anzuchtbedingungen festgelegt auf Verwendung von 1% Galaktose-Medium und eine Kultivationsdauer von 36 hr bei 36°C. Zur Verringerung der Katabolitrepression und rho⁻-Bildung waren die Mutanten vor der Überführung in das 36°C Galaktose-Medium bei 22°C in Laktat-Medium vorgezüchtet worden . Routinemäßig wurde nach der Ernte für jede Mutantenkultur der Anteil an Revertanten und rho⁻-Mutanten bestimmt , und nur solche Kulturen weiter untersucht , die weitgehend frei von diesen waren .

Die bei der Untersuchung von 183 Vertretern aus 180 verschiedenen Komplementationsgruppen erhaltenen Ergebnisse sind in den Tab.1-8 aufgelistet . In ihnen sind die Mutanten bereits zu Gruppen mit charakteristischen Enzymdefekt-Mustern zusammen-

Tab. 1 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.Bzgl. Einzelheiten der Enzymbestimmung vgl. (35)und (36).

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido-reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido-reduktase	Succinat-Dehydrogenase	NADH: Ubichinon Oxido-reduktase	ATPase Gesamt Oligomycin-empfindlich
SC 167 (Wildtyp)	164	244	193	585	1294	6620 4560
ts-5055	167	425	241	409	1134	6082 4466
ts- 657	150	200	196	628	1190	5120 3560
ts- 477	218	212	147	500	1354	6670 4890
ts-3937	93	176	178	431	677	6932 5264
ts- 221	123	583	276	483	2153	7215 5083
ts-4785	97	325	237	392	1880	6883 4900
ts-2901	101	182	121	479	1280	7688 5393
ts-2270	141	452	221	390	2166	4372 1805

Tab. 2 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	spezifische Aktivitäten							ATPase
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	Gesamt	Oligomycin- empfindlich	
ts-1039	-	122	219	490	1982	4803	4085	
ts-2249	-	369	221	324	1062	5982	3223	
ts-1369	-	124	213	378	3298	6405	3408	
ts- 892	-	244	165	300	1218	6272	4340	
ts-1584	-	204	109	209	2426	4491	3150	
ts-1749	-	239	152	357	2340	6149	4324	
ts-1649	-	178	227	365	1488	3634	1922	
ts-3186	-	313	200	292	1955	5744	3909	
ts-2639	-	393	214	291	2122	6049	3230	
ts-3921	-	218	107	257	1462	5497	4208	
ts-1548	-	259	122	264	1529	6138	4307	
ts-3027	-	258	129	218	642	5227	3674	
ts- 645	-	175	121	269	894	7056	4473	
ts-2640	-	155	112	361	1687	5537	3691	

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidase reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxidase reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxidase reduktase	ATPase Gesamt Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts-1689	-	134	121	378	1655	3497 1824
ts-1930	-	191	126	238	2797	3908 2278
ts-4903	-	216	115	473	2755	8034 6081
ts-3767	-	131	122	228	521	2723 1455
ts- 370	-	349	217	271	950	4498 2341
ts-4177	-	233	118	155	1350	4005 2249
ts-1160	-	221	152	196	586	4213 2470
ts- 390	-	148	116	246	1753	4754 3250
ts-3375	-	109	103	312	2729	5692 3041
ts-2857	-	181	104	361	1377	3457 2339
ts- 794	-	200	101	281	1010	2602 1836
ts- 642	-	317	128	180	1991	6432 5430
ts-3745	-	141	131	404	2662	2335 1873
ts-1778	5	207	126	189	927	3868 1805
ts-1285	6	92	99	654	1000	7422 6376
ts-2615	10	332	240	531	1434	8857 5623
ts-2326	12	113	144	526	2051	5901 4031
ts-2061	13	158	176	349	898	3878 2049

Tab. 2 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase
					Gesamt	Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts-4768	16	319	134	213	1097	2849
ts-3052	23	212	158	318	2076	5050
ts-1497	23	276	190	279	1491	4298
ts- 172	27	114	126	171	522	2661
ts-3215	37	283	281	347	845	5563
ts- 571	41	461	450	633	4108	7784
ts- 571	43	263	164	407	903	4940
ts-3543	43	200	116	135	788	3589
ts-1121	56	209	393	419	1812	5365
ts-2669	61	155	151	410	584	4779
ts- 313	62	225	125	396	2573	8570
ts-4246	71	313	248	409	856	5069
ts-4043	80	199	137	417	1432	7222
ts- 771	85	174	169	501	1682	6010
ts-1037	94	502	316	570	2647	9460
						5820

Tab. 3 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido-reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido-reduktase	Succinat-Dehydrogenase	NADH: Ubichinon Oxi-reduktase	Gesamt Oligomycin-empfindlich
ts-3636	-	118	80	393	2328	5993
ts-2398	-	126	87	159	1671	3197
ts-326	-	114	79	202	2035	3573
ts-3411	-	143	95	221	1577	3442
ts-1064	-	135	86	774	2083	3295
ts-2456	-	173	82	165	1680	4484
ts-2470	-	136	62	212	1388	6601
ts-5019	-	109	78	192	943	3538
ts-1402	-	236	99	174	588	4826
ts-3277	-	123	64	190	920	4018
ts-3365	-	90	76	220	3010	7163
ts-4284	-	97	51	159	1635	4246
ts-310	-	162	83	334	980	4320
ts-3640	28	169	98	167	1836	4719

nmol min⁻¹mg⁻¹

Tab. 3 (Fortsetzung)

Hefestamm	Cytochrom Oxidase	spezifische Aktivitäten					Gesamt	Oligomycin- empfindlich
		NADH:		Succinat:		NADH:		
		Cytochrom c Oxidoreduktase	Oxidoreduktase	Cytochrom c Oxidoreduktase	Dehydro- genase	Ubichinon Oxidoreduktase		
nmol min ⁻¹ mg ⁻¹								
ts-2636	20	170	91	429	1162	5523	4403	
ts-1374	20	107	96	250	713	4361	2639	
ts-4683	34	195	88	112	1432	4966	3211	
ts-2973	34	133	97	321	2097	7337	3925	
ts-2635	36	174	139	128	2525	6044	4322	
ts- 345	84	167	170	145	1495	3733	1360	
ts- 575	-	163	194	844	586	4537	2799	
ts-4847	35	94	110	194	118	4815	3378	
ts-1113	-	213	163	756	787	4818	1658	
ts-1666	-	98	109	243	1793	1189	1153	
ts- 841	23	175	143	558	1956	1184	1053	
ts-4281	44	262	164	833	1954	4388	1166	
ts-1305	44	225	216	424	1087	1224	105	
ts-2789	16	158	142	154	851	660	405	
ts-3736	-	394	151	24	577	3447	1444	

Tab. 4 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	Cytochrom Oxidase	spezifische Aktivitäten					Gesamt	Oligomycin- empfindlich
		NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase		
		nmol min ⁻¹ mg ⁻¹						
ts-1527	-	31	51	397	1505	2285	2252	
ts-3224	-	13	24	131	1721	3230	2267	
ts-1147	-	24	17	280	883	3872	2232	
ts-2431	-	42	23	145	2140	5869	3094	
ts-1475	-	47	39	206	1705	4289	3118	
ts-2897	-	54	45	203	1280	3717	2660	
ts-2820	-	52	63	255	2523	3886	2027	
ts-1786	-	90	56	156	956	3457	1961	
ts-4808	8	93	94	457	1748	3520	2410	
ts-3065	-	37	54	292	1007	5458	3937	
ts-1053	8	48	67	810	1349	9650	6990	
ts-2262	15	85	73	136	1222	3444	2027	
ts-3766	8	62	85	228	778	4168	3116	
ts-4363	15	79	66	157	808	3486	2525	

Tab. 4 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten						
	Cytochrom Oxidase	NADH:		Succinat:		NADH: Ubichinon	ATPase
		Cytochrom c Oxidase- reduktase	Cytochrom c Oxidase- reduktase	Cytochrom c Oxidase- reduktase	Succinat- Dehydro- genase		
ts-2754	19	79	37	142	1402	4936	3834
ts-4336	48	85	99	181	826	3417	2252
ts-3840	-	137	15	19	618	3578	2424
ts-3348	-	138	54	39	1665	2886	2573
ts-3418	-	208	49	38	1015	2056	1868
ts- 912	-	109	22	64	1303	4795	2670
ts-3200	-	185	73	79	1678	6865	5081
ts-2081	-	243	40	69	1530	3002	1676
ts-2061	-	217	49	65	1955	4193	2912
ts-5155	-	127	89	81	2075	3917	2748
ts-3639	-	246	88	91	1731	6859	4763
ts-2256	35	154	65	102	1625	3508	1890
ts- 621	37	113	96	135	1112	4055	2695
ts-4842	-	109	26	428	1684	1663	851

Tab. 5 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxi- doreduktase	Succinat: Cytochrom c Oxi- doreduktase	Succinat-Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxi- doreduktase	ATPase
						Gesamt Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts-4519	-	61	28	83	1924	4841
ts-4529	-	-	-	174	848	4811
ts-2838	-	48	24	85	1242	3004
ts- 298	-	45	20	81	762	3940
ts-5052	-	59	11	50	1059	3699
ts-4094	-	86	36	27	982	3266
ts- 348	-	72	37	93	1270	3174
ts-1699	9	100	29	50	2268	5280
ts-2178	-	74	49	116	1252	5824
ts-3757	-	86	32	83	1548	3194
ts-2603	-	92	37	88	1769	3475
ts-3332	-	57	15	373	837	1631
ts-2661	-	29	-	364	1041	1031
						1510
						729

Tab. 5 (Fortsetzung)

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxidoreduktase	Gesamt Oligomycin- empfindlich
				nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
ts-1549	-	24	62	216	890	4100 1622
ts- 820	-	84	35	298	1742	2260 631
ts-3573	-	60	52	267	2556	3098 1577
ts- 337	-	53	57	155	2183	1909 556
ts-3237	3	49	37	187	701	2601 1322
ts-4811	-	74	45	131	1488	2714 1466
ts- 353	38	79	30	153	1034	2135 1422
ts-1714	-	101	-	45	997	1582 770
ts-2135	-	94	44	41	2114	1713 1223
ts-3069	-	107	51	171	1401	2534 1147
ts- 330	-	327	73	126	2116	2628 1164
ts-2263	7	134	61	65	1019	2636 1588

Tab. 6 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH:	Succinat:	Succinat-	NADH:	ATPase
		Cytochrom c Oxido- reduktase	Cytochrom c Oxido- reduktase	Dehydro- genase	Ubichinon Oxido- reduktase	
						Oligomycin- empfindlich
		nmol min ⁻¹ mg ⁻¹				
ts-2240	-	69	-	22	953	719
ts-3762	-	65	22	73	1795	2440
ts-4980	-	74	8	48	1590	2800
ts-2555	-	44	35	76	995	1795
ts-5078	-	48	14	47	680	2639
ts-3514	-	94	7	41	2238	4181
ts-2856	-	95	39	94	944	1881
ts- 374	-	21	39	81	2084	1511
ts-2609	-	54	20	40	604	1738
ts-2630	-	36	18	36	988	2181
ts-2345	-	38	42	114	1917	1277
ts-4442	-	58	8	217	1060	953

Tab. 7 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	Gesamt Oligomycin- empfindlich
	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹					
ts-349	-	14	-	13	66	1165
ts-4689	-	-	-	132	401	959
ts-1242	-	11	-	16	320	313
ts-1541	-	41	33	44	361	3331
ts-4980	-	77	8	34	171	2945
ts-4327	-	69	6	21	133	2704
ts-822	-	-	-	206	132	2615
ts-484	-	88	49	89	88	2386
ts-286	-	17	11	31	61	2392
ts-2856	-	74	18	46	104	2994
ts-2525	-	17	-	32	122	1568
ts-5008	-	-	-	16	45	498
ts-491	-	-	26	146	30	934
ts-3507	-	-	-	-	-	1116
ts-4354	-	14	-	90	193	823

Tab. 7 (Fortsetzung)

Hefestamm	Cytochrom Oxidase	spezifische Aktivitäten					Gesamt	Oligomycin- empfindlich
		NADH: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat: Cytochrom c Oxido- reduktase	Succinat- Dehydro- genase	NADH: Ubichinon Oxido- reduktase	ATPase		
		nmol min ⁻¹ mg ⁻¹						
ts-3622	-	110	27	44	235	3867	1886	
ts-1601	-	70	35	219	221	4745	3752	
ts-4630	-	149	48	84	92	2453	1537	
ts-492	-	98	47	89	118	2704	1562	
ts-2115	-	53	76	208	363	3215	2769	
ts-2136	14	80	73	189	144	3564	2158	
ts-3983	-	57	16	58	643	957	248	

Tab. 8 Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Atmungs-defekter Hefemutanten.

Hefestamm	spezifische Aktivitäten					
	Cytochrom Oxidase	NADH:		Succinat:		ATPase
		Cytochrom c Oxidoreduktase	Oxidoreduktase	Cytochrom c Oxidoreduktase	Dehydro- genase	Gesamt
				Ubichinon	Oxidoreduktase	Oligomycin-empfindlich
ts-3707	76	46	51	209	226	8469
ts-2977	-	98	63	130	596	2969
ts-787	-	56	22	73	513	1844
ts-2022	239	96	73	218	883	3650
ts-1394	30	11	6	91	1686	4020
ts-4908	37	13	51	100	944	4441
ts-4714	71	32	18	55	1039	8372
ts-3760	251	400	273	440	1459	804
						-

gefaßt .

Im einzelnen wurden gefunden :

- (1) Kein Unterschied zum Wildtyp-Muster in 8 Mutanten (vgl. Tab.1).
- (2) Spezifischer Ausfall der Cytochromoxidase (vgl.Tab.2).
Die Gruppe dieser Mutanten ist mit 47 Vertretern die bei weitem zahlenmäßig größte . Dabei konnte entweder überhaupt keine Cytochromoxidase-Aktivität mehr gefunden werden , oder sie war stark reduziert . Demgegenüber zeigten die Aktivitäten der anderen Atmungskettenenzyme keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp .
- (3) Cytochromoxidase fehlt oder ist verringert , sowie eine der folgenden Aktivitäten ist zusätzlich vermindert (vgl. Tab.3).
 - (i) Spezifische Cytochromoxidase/Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase Inaktivierung.
Ein typischer Vertreter dieser Gruppe ist ts-310 . Die Cytochromoxidase fehlt hier vollständig , die Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase Aktivität liegt unter 40 % eines typischen Wildtypwertes , die anderen Aktivitäten meist erheblich über 50 % . Zu dieser Klasse kann man 18 Mutanten rechnen .
 - (ii) Spezifische Cytochromoxidase/Succinat-Dehydrogenase Inaktivierung .
Mit diesem gekoppelten Defekt wurden nur 3 Mutanten ts-345 , ts-2635 und ts-3736 gefunden .
 - (iii) Spezifische Cytochromoxidase/NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase Inaktivierung .
Es wurden 2 Mutanten dieser Gruppe ts-575 und ts-4847 gefunden .
 - (iv) Spezifische Cytochromoxidase/ATP-Synthase Inaktivierung .
Die Gruppe umfaßt 6 Mutanten , wobei sowohl eine Verminderung der oligomycinempfindlichen (ts-4281) , als auch der Gesamt-ATPase (ts-1666) beobachtet

wurde .

- (4) Cytochromoxidase fehlt oder ist verringert , zusätzlich dazu fehlen zwei weitere Aktivitäten oder sind verringert (vgl.Tab.4).
- (i) Spezifische Cytochromoxidase/NADH: Cytochrom c-Oxidoreduktase/Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase Inaktivierung .
Ein Exemplarischer Vertreter dieser 16 Mutanten umfassenden Gruppe ist ts-1527 .
- (ii) Spezifische Cytochromoxidase/Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase Inaktivierung .
Es wurden 11 Vertreter gefunden , ein Beispiel ist ts-3840 .
- (iii) Spezifische Cytochromoxidase/Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase/ATPase Inaktivierung .
Es wurde nur ein Vertreter , ts-4842 , gefunden .
- (5) Cytochromoxidase fehlt oder ist verringert , zusätzlich dazu sind drei weitere Aktivitäten verringert (vgl.Tab.5).
- (i) Spezifische Cytochromoxidase/NADH: Cytochrom c-Oxidoreduktase/Succinat: Cytochrom c-Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase Inaktivierung .
Ein typischer Vertreter dieser 11 Mutanten wäre in ts-4519 zu sehen .
- (ii) Spezifische Cytochromoxidase/NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase/ATPase Inaktivierung .
Vom Typ der Mutante ts-2661 wurden 9 Vertreter gefunden .
- (iii) Spezifische Cytochromoxidase/Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase/ATPase Inaktivierung .
Diesen Defekt wiesen 5 Mutanten auf (z.B. ts-330) .
- (6) Cytochromoxidase/NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase/ATPase Defekt (vgl.Tab.6) .

Bei diesen 14 Mutanten ist lediglich die NADH:Ubi-
chinon Oxidoreduktase wenig oder nicht betroffen.
Ein Beispiel ist ts-2240.

(7) Pleiotrope Effekte (vgl.Tab.7).

In dieser zweitgrößten gefundenen Gruppe (22 Mutan-
ten), sind Mutanten wie ts.349, bei denen alle Akti-
vitäten mehr oder weniger stark vermindert sind.

(8) Spezifische Cytochromoxidase/NADH: Cytochrom c Oxidoreduk-
tase/Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase/NADH: Ubichinon
Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase Inaktivierung.

Es wurden 3 Mutanten gefunden, die diesen nahezu
pleiotropen Phänotyp aufwiesen (vgl.Tab.8).

(9) NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat: Cytochrom c
Oxidoreduktase Defekt (vgl.Tab.8).

Diese einzelne Mutante, ts-2022, ist insofern inter-
essant, als sie eine der wenigen mit erhalten ge-
bliebener Cytochromoxidase-Aktivität ist.

(10) Spezifischer NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat:
Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase/Cyto-
chromoxidase Defekt (vgl.Tab.8).

Die Mutante ts-1394 wurde deshalb einzeln aufgeführt,
weil in ihr die NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase- und
Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivitäten
stärker betroffen sind, als die Cytochromoxidase-
und Succinat-Dehydrogenase-Aktivität. U.U. ist dies
ein Hinweis darauf, daß der auslösende Defekt für
beobachtete Pleiotropie unter den erstgenannten En-
zymen zu suchen ist.

(11) Spezifischer NADH: Cytochrom c Oxidoreduktase/Cytochrom-
oxidase/Succinat: Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat:
Dehydrogenase Defekt (vgl.Tab.8).

Ähnliches wie unter (10) gesagt gilt hier bei der
Mutante ts-4908, bei der die NADH: Cytochrom c Oxi-
doreduktase-Aktivität am stärksten vermindert ist.

- (12) Spezifischer Succinat:Cytochrom c Oxidoreduktase/Cytochromoxidase/NADH:Cytochrom c Oxidoreduktase/Succinat-Dehydrogenase Defekt (vgl.Tab.8).

In der Mutante ts-4714 ist die Succinat:Cytochrom c Oxidoreduktase am stärksten geschädigt.

- (13) Spezifischer ATPase-Defekt (vgl.Tab.8).

Die Mutante ts-3760 war im Rahmen dieser Arbeit die einzige, die keine ATPase-Aktivität mehr aufwies, obwohl alle anderen Aktivitäten noch stark vertreten waren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß unter den untersuchten Mutanten weitaus weniger spezifische Einzeldefekte gefunden wurden, als von der Anzahl der betroffenen Enzymkomplexe und ihrer jeweiligen Untereinheiten hätte erwartet werden können. Neben sehr vielen Mutanten mit einem spezifischen Cytochromoxidase-Defekt (47 Komplementationsgruppen), wurde nur eine einzige Mutante mit einem spezifischen ATPase-Defekt gefunden (ts-3760). Nahezu alle übrigen gefundenen Defekte waren mit einem Verlust der Cytochromoxidase-Aktivität gekoppelt. Dieses Ergebnis, zusammen mit der erstaunlich hohen Zahl spezifischer Cytochromoxidase-Defekte, läßt auf eine besondere, in ihrer Ursache noch unbekannte, Empfindlichkeit dieses Enzyms gegenüber Schädigungen des mitochondriellen Energiestoffwechsels schließen.

Eine andersartige Darstellung der geschilderten und in Tab.1-8 enthaltenen Ergebnisse ist in Fig.10 gezeigt. Hierbei sollten vor allem eventuelle Zusammenhänge beim Auftreten von Mehrfachdefekten deutlicher werden. Die Zahlen geben die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Defektkombinationen an. Gezeigt ist jeweils schematisch die Atmungskette mit ihren charakteristischen Ausgangs- und Verzweigungspunkten. Diejenigen Wege des Elektronentransportes bzw. der ATP-Synthese, die durch die Wirkung der Mutation blockiert sind, wurden durch Verstärkung hervorgehoben. Man sieht, daß in den meisten Fäl-

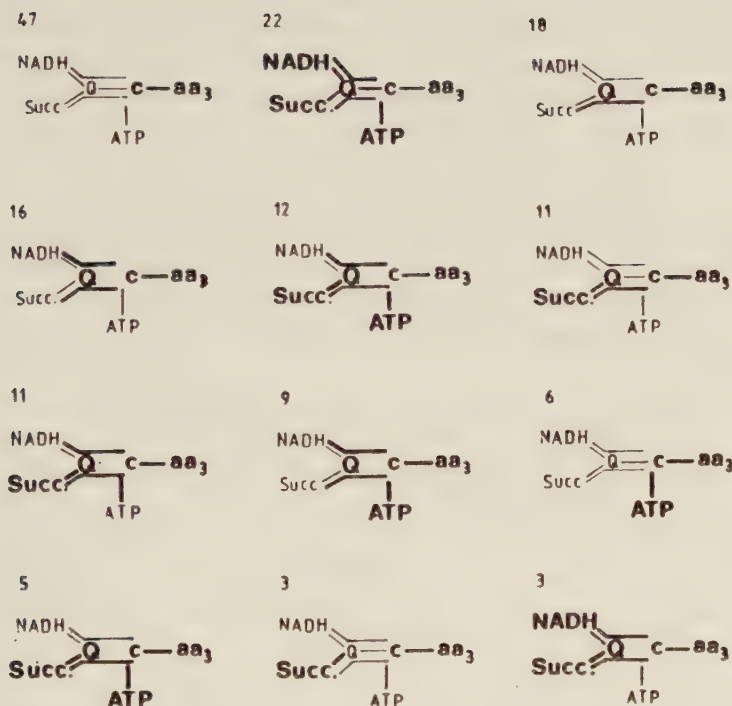


Fig.10 Zusammenhänge bei Mehrfachdefekten in pet-ts Mutanten.

Die in Tab.1-8 enthaltenen Ergebnisse wurden in eine schematische Darstellung umgesetzt. Gezeigt ist jeweils vereinfacht die Atmungskette mit ihren charakteristischen Ausgangs- und Verzweigungspunkten: NADH, Succ.=Succinat, Q=Ubichinon, c=Cytochrom c, aa₃=Cytochromoxidase, ATP. Diejenigen Wege des Elektronentransportes bzw. der ATP-Synthese, die durch die Wirkung der Mutation blockiert sind wurden durch Verstärkung hervorgehoben. Die Zahlen geben die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Defektkombinationen unter den untersuchten pet-ts Mutanten an.

len, abgesehen von den vielen spezifischen Cytochromoxidase-Defekten, eine sich über den gesamten Bereich der Atmungskette erstreckende Schädigung beobachtet wird. Eine naheliegende Erklärung für diese Pleiotropie bietet die Tatsache, daß verschiedene Glieder der Kette von der mitochondriellen Proteinsynthese, und damit von mitochondrieller ATP-Synthese abhängen. Da deren Schädigung aber in den Mutanten stets ein phänotypisch primärer Defekt ist, könnte die Pleiotropie dann die Folge sein. Dagegen könnte eingewendet werden, daß auch die Oligomycinsensitive ATPase von der mitochondriellen Proteinsynthese abhängt. Ihre Aktivität ist aber in einer Reihe von Mutanten nicht beeinträchtigt.

5. Reinigung der Enzymkomplexe bc_1 , ATPase
und Cytochromoxidase aus Hefemitochondrien. Isolierung der Kern-kodierten
Untereinheiten aus gereinigter
Cytochromoxidase.

Der Verlust der Aktivität eines einzelnen Enzyms, wie auch der pleiotrope Ausfall mehrerer Enzymaktivitäten, wie er bei Atmungsketten-Mutanten häufig gefunden wird (s.o.), kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann er die Folge des Verlustes oder der Inaktivierung einer einzelnen Untereinheit in einem der komplex gebauten Atmungsketten-Enzyme sein, oder aber die Mutation bewirkt den koordinierten Ausfall der Synthese mehrerer Untereinheiten, eventuell sogar aus verschiedenen Enzymen der Kette. Es ist möglich, solche proteinchemischen Veränderungen in pet-ts Mutanten gegenüber dem Wildtyp mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die Untereinheiten der betrachteten Enzymkomplexe festzustellen. Eine Voraussetzung für die Gewinnung solcher Antiseren ist die Reindarstellung der betreffenden Untereinheiten aus angereicherten Enzymkomplexen der mitochondriellen Atmungskette. Für die Komplexe bc_1 , ATPase und Cytochromoxidase wurde diese Reinigung und Antikörpergewinnung nach in der Literatur beschriebenen Verfahren durchgeführt (37,38). Weiterhin wurden aus gereinigter Cytochromoxidase die Kern-kodierten Untereinheiten IV, V, VI und VII durch präparative SDS-Gelelektrophorese isoliert.

In Fig. 11 ist das Bandenmuster des isolierten Oligomycin-sensitiven ATPase-Komplexes nach SDS-Gelelektrophorese zu sehen. Oligomycinsensitive ATPase wurde, etwas abweichend von der Literatur, wie in Material und Methoden beschrieben angereichert. Der ATPase-Komplex war offenbar vor allem im hochmolekularen Bereich noch verunreinigt, was wahrscheinlich auf eine nicht optimal verlaufende Säulenchromatographie an Ultrogel Aca 34 zurückzuführen ist. Auch scheint die ATPase-Präparation zu einem gewissen Teil die für die Oligomycin-Sensitivität verantwortlichen Teile F_0 und OSCP verloren zu haben.



Fig.11 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von angereicherter Oligomycinsensitiver ATPase. Die Bezeichnung der Untereinheiten erfolgte gemäß (55). Es wurden 10 μ g Protein aufgetragen. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

Dafür spricht, daß die F_1 -ATPase Untereinheiten α und β gegenüber den anderen überrepräsentiert sind, Trotzdem scheint es möglich aus dieser Präparation die Untereinheiten β , δ und ϵ sowie I, II, III und IV zu isolieren. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht versucht.

In Fig.12 sind das Cytochrom-Spektrum und das SDS-Gel Bandenmuster des nach Literaturangaben isolierten bc_1 -Komplexes gezeigt. Spektral erscheint der Komplex einheitlich. Im SDS-Gel sind im hochmolekularen Bereich nur wenige Verunreinigungen zu sehen. Stärkere, in der Literatur nicht beschriebene Banden zeigen sich bei 28 000, 16 000 und 12 000 Dalton. Überraschend ist, daß die – angeblich eine Verunreinigung darstellende – 28 000 Dalton-Bande dieselbe Stärke besitzt wie die Untereinheiten I, II und III des bc_1 -Komplexes. Auch hier sind offensichtlich die Reinheit der Enzympräparation und die Auflösung der Banden auf dem Gel ausreichend, um daraus präparativ die verschiedenen Untereinheiten des bc_1 -Komplexes zu

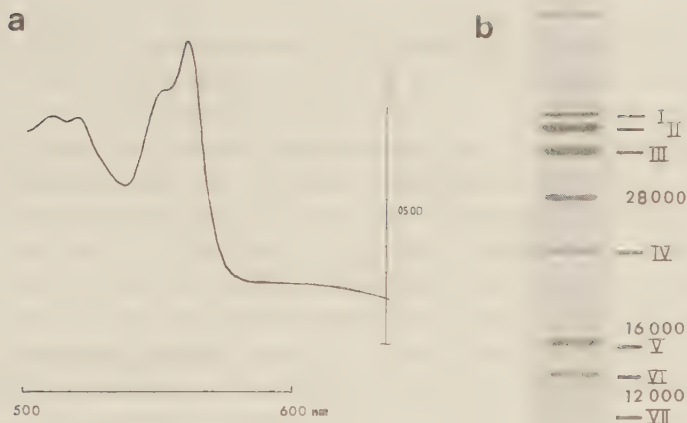


Fig.12 Cytochrom-Spektrum (a) und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (b) von gereinigtem Komplex III aus Bäckerhefe .

Cytochrom-Spektren wurden als Differenzspektren reduziert gegen oxidiert bei RT gemessen. Zur Gelelektrophorese wurden etwa 10 μ g Protein eingesetzt. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

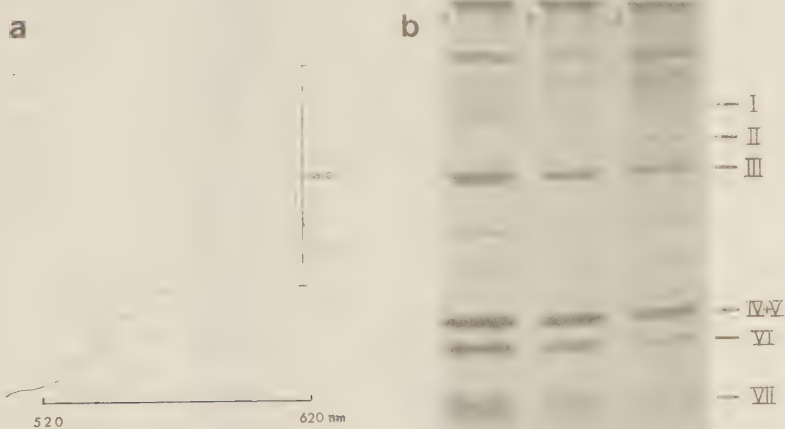


Fig.13 Cytochrom-Spektrum (a) und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (b) von gereinigter Cytochromoxidase aus Bäckerhefe .

Cytochrom-Spektren wurden als Differenzspektren reduziert gegen oxidiert bei RT gemessen. Zur Gelelektrophorese wurden etwa 10 μ g Protein aus drei verschiedenen Präparationen (1-3) eingesetzt. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

isolieren. Aus Zeitmangel wurde auch in diesem Fall darauf verzichtet.

Cytochromoxidase war bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit gereinigt, und Antikörper gegen das native Gesamtzym aus Kaninchenserum isoliert worden. Die Enzympräparation wurde hier nur insoweit etwas verändert, als es darauf ankam, in möglichst kurzer Zeit hohe Ausbeuten an Enzymprotein zu isolieren, welches im Bereich der vier Kern-kodierten Untereinheiten auf dem SDS-Gel möglichst frei von Verunreinigungen war. In Fig.13 sind das Cytochrom-Spektrum und die SDS-Gel Bandenmuster von zwei verschiedenen Cytochromoxidase Präparationen gezeigt. Aus diesen Präparationen konnten die vier Kern-kodierten Untereinheiten IV+V, VI und VII präparativ isoliert

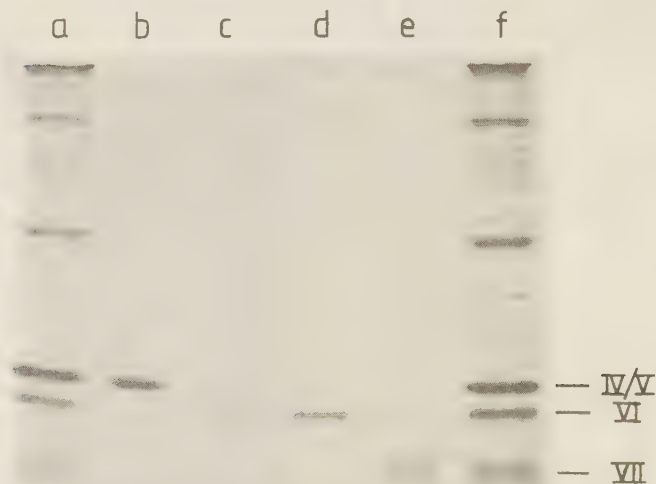


Fig.14 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von gereinigter Cytochromoxidase und daraus präparativ isolierten Untereinheiten. Cytochromoxidase (a,f), Untereinheiten: IV+V (b), IV+V/VI (c), VI/VII (d), VII (e). Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung s. Material und Methoden.

werden. Allerdings war es mit dem benutzten Gelsystem nicht möglich, die Untereinheiten IV und V voneinander zu trennen, weshalb sie gemeinsam isoliert wurden. In Fig.14 sind die Bandenmuster der isolierten Cytochromoxidase Untereinheiten zusammen mit dem des Gesamtzyms gezeigt. Man sieht, daß die Untereinheiten IV+V und VII rein gewonnen werden konnten. Grundsätzlich war dies auch bei Untereinheit VI der Fall. Es war lediglich je einmal eine Probe der gereinigten Untereinheit IV+V bzw. VII auf Grund einer Verwechslung mit der gereinigten Untereinheit VI vermischt worden. Auch die Weiterführung dieser Arbeiten wurde zugunsten anderer zurückgestellt.

6. Anwendung der "Western-blot"-Technik zum Nachweis von Cytochromoxidase Untereinheiten in atmungsdefekten pet-ts Mutanten mit Hilfe von Antikörpern gegen das native Gesamtzym.

Mit der sog. "Western-blot"-Technik (41) ist es möglich, gelelektrophoretisch aufgetrennt, Proteine vom Polyacrylamidgel auf Nitrocellulosefilter zu übertragen, dort mit spezifischen Antikörpern zur Reaktion zu bringen und den gebildeten Antigen/Antikörper-Komplex durch "Dekoration" mit ^{125}J -markiertem Protein A autoradiographisch nachzuweisen. Auf diese Weise ist es möglich, in einem heterogenen Proteingemisch, bestimmte Proteine immunologisch nachzuweisen und gleichzeitig mutationsbedingte Veränderungen – wie etwa geänderte Größen – zu erkennen. Diese Technik stellt somit ein geeignetes Instrument dar, pet-ts Mutanten nach proteinchemisch veränderten oder gegenüber dem Wildtyp anders kompartimentierten Komponenten bestimmter Atmungskettenenzyme zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden mit den zur Verfügung stehenden Cytochromoxidase-Antikörpern Vorversuche in dieser Richtung unternommen.

In Fig.15 ist die SDS-Gelelektrophoretische Auftrennung einer Cytochromoxidase-Präparation gezeigt, daneben das Auto-

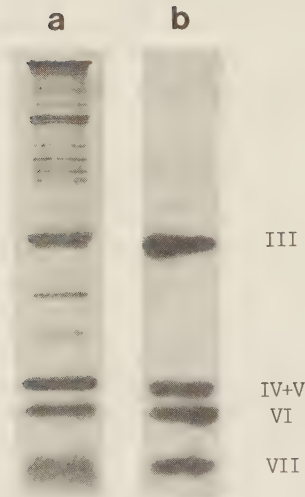


Fig.15 "Western-blot" Analyse von gereinigter Cytochromoxidase.

Gereinigte Cytochromoxidase (ca.7 μ g) wurde in einem 15% igen Polyacrylamidgel elektrophoretisiert (a), auf Nitrocellulosefilter übertragen und immunologisch mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen das native Gesamtzym und 125 J-markiertem Protein A autoradiographisch nachgewiesen (b). Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

radiogramm des zugehörigen "Western-blot's". Man sieht, daß die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen natives Gesamt-enzym nur mit den Untereinheiten III, IV+V, VI und VII eine Reaktion eingehen. Weiter sieht man, daß die benutzten Antikörper spezifisch waren und mit keiner der in dieser Cytochromoxidase Präparation vorhandenen Verunreinigungen reagierten. Die Tatsache, daß von den nativen Antikörpern nur die vier Kern-kodierten und die mitochondriell kodierte Untereinheit III, nicht aber die mitochondriell kodierte Untereinheiten I und II erkannt wurden, läßt mehrere Deutungen zu: entweder sind die mitochondriell kodierte Untereinheiten I und II im nativen Enzym von außen nicht zugänglich, sodaß gegen sie keine Antikörper gebildet werden konnten, oder die beiden Untereinheiten wurden durch die Behandlung mit SDS vor und während der Elektrophorese so in ihrer Tertiärstruktur verändert, daß sie von Antikörpern gegen die nativen Proteine nicht mehr erkannt werden konnten. Schließlich ist es auch denkbar, und im Fall der drei großen Untereinheiten der Cytochromoxidase aus Mensch, Hefe und Bakterien bekannt, daß sie ihre Aminosäuresequenz stark konserviert haben (56). Dies könnte dazu führen, daß für das Kaninchen die aus Hefe isolierten Untereinheiten nicht genügend antigen waren um es zur Antikörperproduktion anzuregen. Zumindest für Untereinheit I wird in der Literatur diskutiert, daß sie vollständig im Inneren des Cytochromoxidase-Komplexes verborgen ist (57). Damit könnte hier die erstgenannte Möglichkeit zutreffen. In Bezug auf Untereinheit II läßt sich keine Aussage machen.

In Fig.16 sind die Autoradiogramme zweier Versuche gezeigt, in denen die Existenz einzelner Cytochromoxidase Untereinheiten mit Hilfe der "Western-blot"-Technik in Zellextrakten aus verschiedenen pet-ts Mutanten nachgewiesen werden sollten. Abgesehen von den in diesen Versuchen noch vorhandenen experimentellen Unzulänglichkeiten bei der Elektrophorese von Zellextrakten, zeigt Fig.16, daß es grundsätzlich möglich ist, mit dieser Methode das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Kern-kodierter Untereinheiten der Cytochromoxidase nachzuwei-

sen. So sind im Fall der Mutante ts-642 die Untereinheiten IV+V ebenso wie Untereinheit VI sehr viel schwächer markiert als dies bei Verwendung einer gereinigten Enzympräparation oder im Wildtyp-Zellextrakt der Fall war. Eine zu geringe Probenaufgabe ist als Ursache für den fehlenden Nachweis auszuschließen, da die Markierungen verschiedener Komponenten im hochmolekularen Bereich stärker hervortraten als im Wildtyp-Extrakt. Auffällig ist das Vorhandensein vieler, speziell großer Banden in allen untersuchten Zellextrakten, nicht aber im gereinigten Enzym. Oft wird es sich hierbei um unspezifische Antikörper/Protein-Bindungen handeln. Eine Bande im Bereich hohen Molekulargewichts bei Extrakten aus Wildtyp- oder pet-ts Mutanten-Zellen weist allerdings eine für unspezifische Hybridisierungen unwahrscheinlich starke Schwärzung auf. In diesem Zusammenhang könnte Bezug genommen werden auf Arbeiten von Poyton, die über eine potentielle Vorstufe berichten, welche die vier Kern-kodierten Cytochromoxidase Untereinheiten zunächst in einer einzigen Aminosäurekette vereinigt enthält (58). Andere Autoren konnten diesen Befund allerdings nicht bestätigen (59). Auch in einem "in vitro" Translationsexperiment am hiesigen Institut wurde mit den zur Verfügung stehenden Cytochromoxidase-Antikörpern nur eine einzige Proteinbande nachgewiesen. Diese besaß ein Molekulargewicht, das in etwa der Summe aus den vier Kern-kodierten Untereinheiten entsprach (C.Postius, unveröff.Exp.). Der Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

Aus Fig.16 geht weiterhin hervor, daß die Mutante ts-5019 allem Anschein nach gegenüber dem Wildtyp einen Ausfall der Untereinheiten VI und VII der Cytochromoxidase aufweist. Es stellt sich aber hier, ebenso wie bei den oben beschriebenen Enzymatischen Analysen, die Frage, inwieweit dieser Effekt eine fehlende Neusynthese der Proteine oder ihren beschleunigten Abbau widerspiegelt. Zur Klärung dieser Frage müßten Experimente mit radioaktiver Pulsmarkierung der Mutanten durchgeführt werden. Auf diese Weise könnte die Syntheserate und nicht nur die "steady state"-Konzentration bestimmt werden.

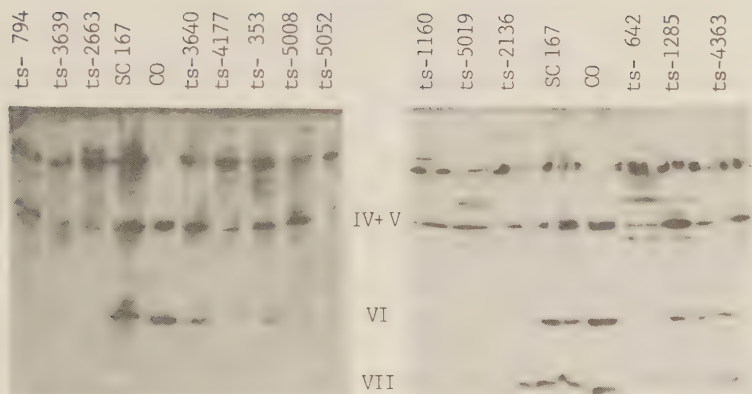


Fig.16 "Western-blot" Analyse der Zellextrakte ausgewählter pet-ts Mutanten.

Hefezellen wurden in 50 mM Tris-Cl pH 7.5 / 0.25 M Sorbit / 10 mM EDTA / 5 mM PMSF durch Schütteln mit Glasperlen (0.5 mm Ø) im Zellhomogenisator aufgeschlossen, durch Zentrifugation (1100 x g, 10 min, 4 °C) von Zellwänden und Zellkernen befreit und der so erhaltene Überstand einer SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese in einem 15-20 % Gradientengel unterworfen. Nach Übertragen auf Nitrocellulosefilter wurden die aufgetrennten Cytochromoxidase Untereinheiten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das native Gesamtzym und ¹²⁵J-markiertem Protein A autoradiographisch nachgewiesen. Bzgl. Einzelheiten der "Western-blot" Analyse vgl. Material und Methoden.

CO = gereinigte Cytochromoxidase

B. Restriktionskartierung der mitochondriellen DNA des Saccharomyces cerevisiae Stammes SC167.

Die mtDNA's verschiedener Organismen sind sich hinsichtlich ihrer Funktion, d.h. der Art der durch sie kodierten Gene sehr ähnlich (61). Auf der anderen Seite wurde bereits erwähnt, daß sich die mtDNA's verschiedener Organismenklassen in struktureller Hinsicht stark voneinander unterscheiden. Selbst innerhalb ein und derselben Spezies, wie etwa den Hefen, werden hinsichtlich der Größe des mtGenoms, der relativen Anordnung der Gene auf demselben und sogar der Feinstruktur einzelner Gene deutliche Unterschiede beobachtet. So hat zum Beispiel die petite-positive Hefe S.cerevisiae eine mtGenom-Größe von 25 μm während die petite-negativen Hefen wie Schizosaccharomyces pombe und Candida nur 6-8 μm Länge haben (62,63). Selbst unter verschiedenen S.cerevisiae Stämmen hat man Unterschiede festgestellt, was z.B. die Zahl der Introns im CYT b-, OXI 3- oder 21 S rRNA-Gen anbetrifft (12,13,16,18,64). Daher erschien es notwendig, durch Restriktionskartierung die genaue mtDNA-Struktur des Stammes SC167 zu ermitteln. Dieser Stamm war als Ausgangsstamm für die Herstellung der pet-ts Mutanten Sammlung an unserem Institut benutzt worden. Für die vorgesehene Charakterisierung von OXI 3-Transkripten und ihrer Reifung zur fertigen mRNA war die Kenntnis der Mosaikstruktur von OXI 3 eine Voraussetzung. Auch für die Gewinnung geeigneter DNA-Fragmente zur "Northern-blot"-Hybridisierung, etwa durch Klonierung, war eine solche Kenntnis nötig. Es wurde daher zunächst eine Restriktionskartierung von SC167 mtDNA, vor allem auch im Vergleich mit der in ihrer Struktur bereits bekannten mtDNA des Stammes KL14-4A (6) unternommen.

1. Vorversuche zur Isolierung mitochondrieller DNA aus Hefe.

In der Literatur sind eine Reihe von Verfahren zur Isolierung mitochondrieller DNA beschrieben (44,65,66). Daher erschien es zunächst sinnvoll, festzustellen, welche dieser Methoden für unsere Zwecke und den von uns verwendeten Hefestamm und Wachstumsbedingungen am besten geeignet waren. Variationen hinsichtlich Ausbeute und Reinheit der isolierten mtDNA waren durchaus denkbar. Es wurden vor allem drei verschiedene Methoden geprüft. Sie unterschieden sich grundsätzlich hinsichtlich der Art des Hefezell-Aufschlusses (mechanisch durch Schütteln mit Glasperlen bzw. durch Kochen), weiterhin dadurch, daß nicht immer von gereinigten Mitochondrien als Zwischenstufe ausgegangen wurde, und schließlich durch die Methode mit der verunreinigende Kern-DNA von der mtDNA abgetrennt wurde (Hydroxylapatit-Chromatographie, Hitzefällung, Bis-Benzimid oder DAPI/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation). Die drei Methoden sind im einzelnen unter Material und Methoden beschrieben. Als Ergebnis des Vergleichs der verschiedenen Methoden wurde erhalten:

1. Die bei der Abtrennung von Plasmid-DNA von chromosomaler bakterieller DNA bewährte Methode der Chromatographie an Hydroxylapatit erwies sich für die Trennung von Kern- und Mitochondrien-DNA der Hefe als nicht geeignet. Bei Auftrag von insgesamt 1 mg angereicherter mtDNA konnten nur 5 µg DNA von der Säule wieder eluiert werden (Fig.17). Abgesehen von dieser extrem schlechten Ausbeute war die eluierte DNA entsprechend ihrer Spaltbarkeit mit EcoRI offensichtlich auch keine Wildtyp mtDNA.

2. Für die Trennung von Kern- und mtDNA war die differentielle Komplexierung von mtDNA mit Bisbenzimid offensichtlich besser geeignet als die mit DAPI. Der Dichteunterschied war im erstgenannten Fall um 75 % größer als im zweiten (Fig.18). In der Literatur war eine 30 % geringere Trennung bei einem anderen Hefestamm beschrieben worden (67).

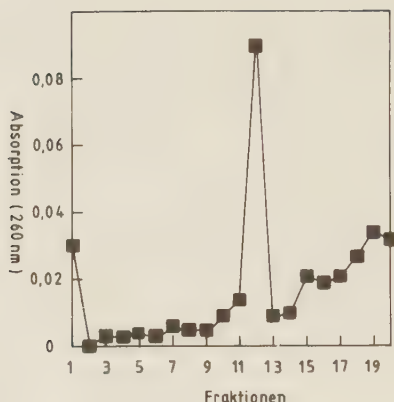


Fig.17 Hydroxylapatit-Säulenchromatographie von mtDNA .

1 mg mtDNA wurde für 2 min auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die DNA-Lösung wurde in einem Gesamtvolumen von 10 ml auf 7 M Harnstoff und 100 mM Na-PO₄ pH 6.8 gebracht und mit 1 g Hydroxylapatit gemischt. Die Mischung wurde in eine Säule (8 x 1.5 cm) gefüllt und mit 15 ml 7 M Harnstoff/100 mM Na-PO₄ pH 6.8 gefolgt von 15 ml 15 mM Na-PO₄ pH 6.8 gewaschen. Danach wurde mit 150 mM Na-PO₄ pH 6.8 in 1 ml Fraktionen eluiert und deren Absorption bei 260 nm gemessen.

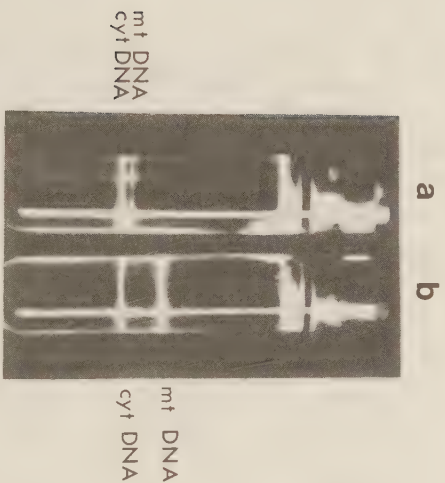


Fig.18 Farbstoff/CsCl-Dichtegradienten Zentrifugation von SC 167 mtDNA .

Je 1 mg DNA aus isolierten Mitochondrien in einer CsCl-haltigen Lsg. von 10 mM Tris-Cl pH 8.2/10 mM EDTA/100 mM NaCl/2 % Sarkosyl der Dichte 1.40 wurde mit 0.1 mg/ml DAPI (a) bzw. Bisbenzimid (b) versetzt und 48 hr zentrifugiert (40 000 x g, 20°C, Rotor 50Ti). Anschließend wurde das Fluoreszenz-Bandenmuster unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert.

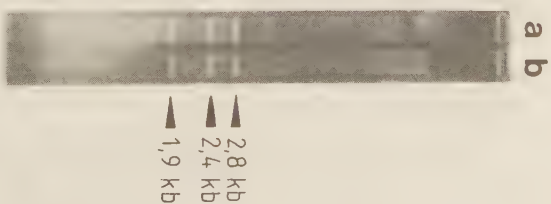


Fig.19 Restriktionsspaltung von SC 167 mtDNA .

SC 167 mtDNA wurde durch Hitzebehandlung von Hefe-Sphäroplasten wie in Material und Methoden (23) beschrieben isoliert und anschließend einer Bisbenzimid/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Nach Isolierung der gereinigten mtDNA und Restriktionsspaltung mit Eco RI (a) bzw. Eco RI/Bam HI (b) wurden die Restriktionsfragmente in einem 0.5 % Agarosegel analysiert.

3. Eine Methode welche in E.coli-Zellen zur raschen Reinigung von Plasmid-DNA verwendet werden kann, ist die Hitzebehandlung ganzer Zellen in Detergenz-haltigem Puffer (68). Hierbei sollen Kern-DNA und denaturierte Proteine eine Fällung bilden, während extrachromosomale DNA im Überstand verbleibt. Wenn diese Methode auf Hefe-Sphäroplasten angewendet wurde, konnte tatsächlich eine praktisch Kern-DNA freie mtDNA in guter Ausbeute erhalten werden. In Fig.19 ist ein typisches Restriktionsmuster einer so gewonnenen und daran anschließend noch durch Bisbenzimid/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigten mtDNA im Vergleich zu einer nach herkömmlichen Methoden (Mitochondrien-Reinigung) isolierter mtDNA gezeigt. Der Unterschied zwischen den beiden DNA-Präparationen liegt in dem Vorhandensein dreier zusätzlicher Restriktionsfragmente mit den Größen 2.8, 2.4 und 1.9 kb, in der durch Sphäroplast-Denaturierung gewonnenen DNA (Pfeile). Ihre Herkunft und Natur wurden nicht weiter untersucht. Man könnte an 2 μ DNA oder an zirkularisierte Chromosomen bzw. Chromosomenfragmente denken, jedoch spricht deren Lokalisation im Zellkern dagegen. Die von der der anderen Banden abweichende Fluoreszenz-Intensität der drei zusätzliche Fragmente spricht jedenfalls gegen eine Zugehörigkeit zur mtDNA. Obwohl diese Methode somit einen schnellen und effektiven Weg zur Gewinnung von mtDNA darstellt, wurde vor allem auf Grund des Auftretens der genannten nicht identifizierten zusätzlichen DNA-Fragmente bei der Restriktionsanalyse von so gewonnener mtDNA auf die Verwendung dieser Methode verzichtet. Sie ließe sich jedoch überall dort vorteilhaft einsetzen, wo eine große Anzahl mtDNA's aus kleinen Zellmengen mit Hilfe spezifischer Hybridisierungen untersucht werden sollen.

4. Als am besten geeignete Methode wurde schließlich die Isolierung von mtDNA aus angereicherten Mitochondrien durch Detergenz-Lyse mit anschließender Bisbenzimid/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation für alle weiteren Versuche verwendet (vgl.Material und Methoden).

2. Spaltmuster und Anzahl der Restriktionsfragmente der SC 167 mtDNA.

Um einen ersten Überblick über die Zahl und Größe der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen entstehenden mtDNA-Fragmente zu erhalten wurde gereinigte SC 167 mtDNA mit 16 verschiedenen Restriktionsenzymen erschöpfend verdaut. Die dabei erhaltenen Restriktionsfragment-Muster sind in Fig. 20 dargestellt. Beim Auswerten der so erhaltenen Elektropherogramme fiel auf, daß die mit den verschiedenen Endonukleasen erhaltenen Fragmente sich nicht zu jeweils derselben Gesamtlänge an Ausgangs mtDNA addieren ließen. Die Werte streuten zwischen 25 und 85 kb. Eine Erklärung hierfür wird allgemein darin gesehen, daß die zur Untersuchung eingesetzte mtDNA zum ganz überwiegenden Teil nicht mehr aus intakten Molekülen besteht. Auch andere Autoren berichten von der Schwierigkeit bzw. Unmöglichkeit, intakte mtDNA zu isolieren (68, 69, 70). Die durchschnittliche Größe von gereinigter mtDNA liegt im Bereich von 20 kb gegenüber ca. 80 kb bei intakter mtDNA. Als Folge dieser statistischen Fragmentierung kann man erwarten, daß in einem Restriktionsspaltgemisch sehr große Fragmente gegenüber den kleinen unterrepräsentiert sind und u.U. sogar nicht mehr nachweisbar sind. So sollte immer dann, wenn ein zu erwartendes Restriktionsfragment größer ist als die mittlere Fragmentlänge der statistisch gesicherten DNA, anstelle einer diskreten Bande ein Banden-Kontinuum sich als heller Hintergrund sich im Trenngel zu erkennen geben. Ein solches Kontinuum ist z.B. in Fig. 20 Bahn o anstelle des größten und hier nicht sichtbaren Bam HI-Fragmentes zu sehen. Wie Fig. 20 zeigt, erscheint somit bei der Verdauung von mtDNA mit Enzymen, für die nur wenige Schnittstellen vorhanden sind, bei hohem Molekulargewicht ein heller Hintergrund, der zu kleineren Molekulargewichten hin abnimmt (z.B. Fig. 20 Bahn h). Bei öfter schneidenden Enzymen ist dieser Hintergrund deutlich geringer (z.B. Fig. 20 Bahn k). Sinkt jedoch die Restriktionsfragmentgröße unter die der statistischen Fragmente ab, so können

a b c d e f g h i j k l m



Fig.20 Vergleich der Elektrophorese-Bandenmuster
verschiedener Restriktionsspaltungen von
SC167 mtDNA .

Je 0.5 μ g SC167 mtDNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen Cla I (a), Xho I (b), Xba I (c), Bgl II (d), Sma I (e), Msp I (f), Pst I (g), Hind III (h), Hinf I (i), Alu I (j), Hpa II (k), Sal I (l) und Pvu II (m) erschöpfend verdaut, in einem 0.5% igen Agarose-Gel elektrophoretisiert und nach anschließender EtBr-Färbung photographiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

mehr gleichartige intakte Restriktionsfragmente erzeugt werden, die sich dann als diskrete Bande vor einem gleichzeitig schwächer werdenden Hintergrund abheben. Dies ist deutlich in dem in Fig.21 dargestellten Experiment zu sehen. Während bei einer Einfach-Verdauung mit EcoRI nur 5 Restriktionsfragmente erkennbar sind, kommen bei einer Doppelverdauung mit EcoRI und SalI noch zwei weitere Fragmente hinzu, ohne daß dafür eines der schon vorher vorhandenen verschwindet. Was jedoch deutlich abnimmt ist ein zuvor vorhandenes Bandenkontinuum im hochmolekularen Bereich. Auf eine weitere Anomalie der Restriktionsverdauung von mtDNA soll hier ebenfalls hingewiesen werden, welche mit demselben oben erwähnten Phänomen zusammenhängt. Die Fluoreszenzintensität der Ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden welche in erster Näherung mit der Größe der Banden und damit der Menge gebundenen Farbstoffs zunehmen sollte, nimmt bei größeren mtDNA-Fragmenten mit zunehmender Größe ab. Erst im Bereich kleiner und mittlerer DNA-Fragmente besteht wieder eine direkte Korrelation zwischen Fragmentgröße und EtBr-Färbung. Ein Beispiel für diesen Effekt ist in Fig.20 Bahn c zu sehen. Die geschilderten besonderen und bei der Restriktionskartierung anderer DNA's gewöhnlich nicht beobachteten Verhaltensweisen von mtDNA müssen bei der Bestimmung der Anzahl der Restriktionsfragmente für ein bestimmtes Enzym und bei der Ermittlung der Genomlänge in Betracht gezogen werden.

Die in Fig.20 gezeigten Experimente hatten ergeben, daß keines der von uns eingesetzten Restriktionsenzyme die mtDNA in eine praktikable Anzahl nicht zu großer (s.o.) Fragmente zerlegte. Das Ziel, die Restriktionskartierung, konnte daher nur über eine Kombination geeigneter Restriktionsendonukleasen durch gleichzeitige Mehrfachverdauung der mtDNA erreicht werden. Als Ausgangspunkte dafür dienten vor allem Spaltgemische, die ausgehend von den Enzymen EcoRI, BamHI und HincII erhalten wurden. Diese wurden dann in Doppel- und Mehrfachverdauungen zusätzlich noch mit den Enzymen SalI, HindIII, XhoI, ClaI, BglIII oder XbaI gespalten. Die Fig.22-26 zeigen die

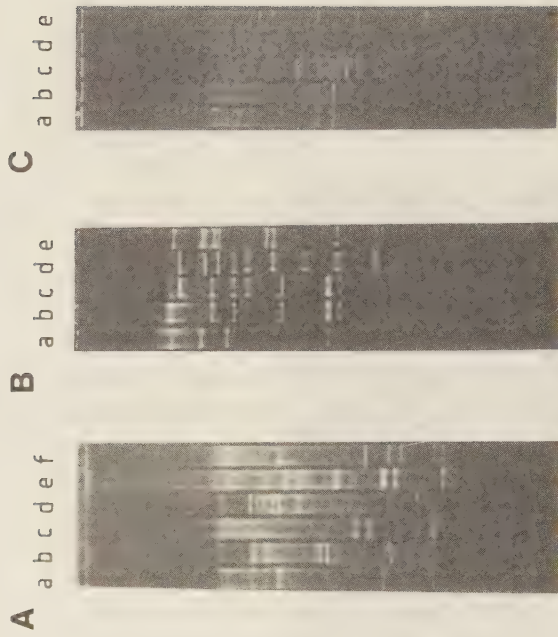


Fig. 22 Vergleich von Einfach- und Mehrfach-Restriktionsspaltungen der SC 167 mtDNA.

Ausgehend von den Restriktionsenzymen Eco RI (A, B) u. Bam HI (C) wurden in erschöpfenden Verdauungen von je 0.5 µg SC 167 mtDNA bis zu drei weitere Restriktionsenzyme eingesetzt. Eco RI/Sal I (Aa), Eco RI/Sal I/Bam HI (Ab), Eco RI/Sal I/Hind II (Ac), Eco RI/Sal I/Cla I (Ad), Eco RI/Sal I/Xba I (Ae), Eco RI/Sal I/Bgl II (Af), Eco RI (Ba), Eco RI/Xba I (Bb), Eco RI/Sal I/Xba I (Bc), Eco RI/Sal I/Xba I/Bam HI (Bd), Eco RI/Sal I/Bam HI (Be), Bam HI (Ca), Bam HI/Sal I (Cb), Bam HI/Sal I/Xba I (Cc), Bam HI/Sal I/Hind II (Cd), Bam HI/Sal I/Cla I (Ce).

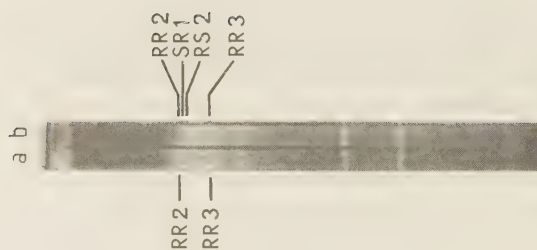


Fig. 21 Eco RI- und Eco RI/Sal I-Restriktionsspaltung von SC 167 mtDNA.

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden mit Eco RI (a) bzw. Eco RI + Sal I (b) erschöpfend verdaut. Die Bezeichnung der Restriktionsfragmente erfolgte gemäß Tab. 11. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

a b c d e f g h i j k l m n o p

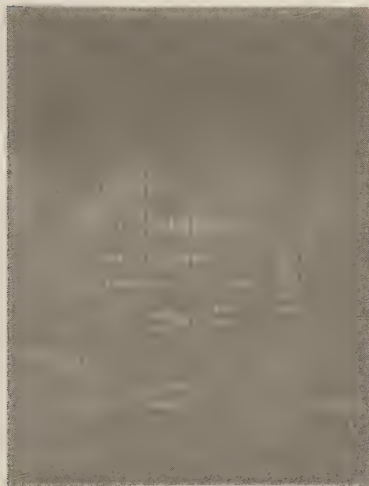


Fig.23 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA .

SC 167 mtDNA wurde mit den Restriktionsenzymen Eco R1/ Sal I/Xho I (a), Eco R1/Sal I/Xba I/Xho I (b), Bam H1/Sal I/ Xba I/Eco R1 (c), Eco R1/Bam H1/Sal I/Xho I (d), Bam H1/Xba I/ Sal I (e), Bam H1/Sal I/Xho I (f), Bam H1/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Eco R1/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I/ Xho I (j), Bam H1/Hind III/Sal I/Xho I (k), Eco R1/Sal I/Bgl II (l), Hinc II/Xho i (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco R1/Sal I/Hind III/Xho I (o), KL14-4A mtDNA Eco R1/Hind III/Sal I (p) erschöpfend verdaut. Nach Elektrophorese in einem 0.5 % Agarosegel und anschließender EtBr-Färbung wurde wurde das Gel unter Beleuchtung mit langwelligem UV- Licht photographiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

a b c d e f g h i j k l m n o

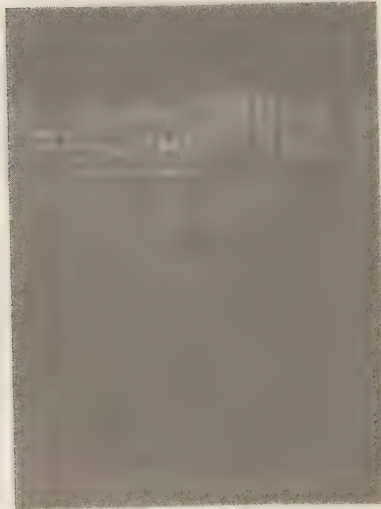


Fig.24 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA .

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden in Einzel- und Mehrfachverdauungen erschöpfend restriktionsgespalten. Folgende Enzyme wurden jeweils eingesetzt : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Bam HI (b), Bam HI/Xba I/Eco RI/Sal I (c), Bam HI/Xba I/Sal I (d), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (e), Eco RI/Xba I/Sal I (f), Xba I/Cla I/Sal I (g), Eco RI/Cla I/Sal I (h), Hind III/Xba I (i), Bam HI (j), Bam HI/Hind III (k), Cla I/Sal I/Bgl II (l), Eco RI/Sal I/Bgl II (m), Hinc II (n), KL14-4A mtDNA Eco RI (o). Die Restriktionsgemische wurden anschließend in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert. Danach wurde das Gel mit EtBr gefärbt und unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

a b c d e f g h i j k l m n o



Fig.25 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA .

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden in Einzel- und Mehrfachverdauungen erschöpfend restriktionsgespalten. Folgende Enzyme wurden jeweils eingesetzt : Eco RI (a), Eco RI/ Sal I (b), Eco RI/ Sal I/ Bam HI (c), Eco RI/ Sal I/ Hind III (d), Eco RI/ Sal I/ Cla I (e), Eco RI/ Sal I/ Xba I (f), Eco RI/ Sal I/ Bgl II (g), Bam HI/ Sal I (h), Bam HI/ Sal I/ Xba I (i), Bam HI/ Sal I/ Xba I/ Eco RI (j), Cla I/ Sal I/ Bgl II (k), Xba I/ Hind III/ Sal I (l), Bam HI/ Hind III/ Sal I (m), Hinc II (n), KL14-4A mtDNA Eco RI/ Hind III/ Sal I (o). Die Restriktionsgemische wurden anschließend in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert, danach mit EtBr gefärbt und unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

a b c d e f g h i j k l m n o p

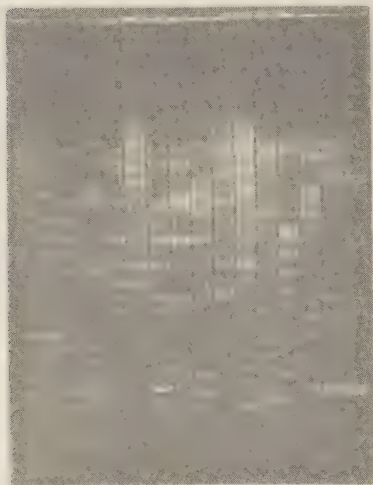


Fig.26 Restriktionsverdauungen von SC 167 mtDNA .

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden in Einzel- und Mehrfachverdauungen erschöpfend restriktionsgespalten. Folgende Enzyme wurden jeweils eingesetzt: Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Xba I (b), Bam HI/Xba I/Eco RI/Sal I (c), Eco RI/Bam HI/Sal I/Xho I (d), Bam HI/Xba I/Sal I (e); Bam HI/Sal I (f), Bam HI/Xba I/sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Eco RI/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I (j), Bam HI/Hind III/Sal I (k), Eco RI/Sal I/Bgl II (l), Hinc II (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco RI/Hind III/Sal I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p). Die Restriktionsgemische wurden in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert, danach mit EtBr gefärbt und unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

EtBr-gefärbten Agarose-Gele solcher Mehrfachverdauungen. Die Nützlichkeit dieser Methode sei anhand von Fig.22 A kurz erläutert. Hier sind die Ergebnisse einer Reihe von Verdauungsexperimenten gezeigt, bei denen das Spaltgemisch nach und nach jeweils um ein weiteres Enzym vermehrt wurde. Ein Vergleich der EcoRI/Xba I-Verdauung in Bahn b mit der EcoRI-Verdauung in Bahn a zeigt, daß die zweite EcoRI-Bande von einer zusätzlichen Xba I-Spaltung nicht beeinflußt wird, ebensowenig wie durch eine weitere Spaltung mit Sal I (Bahn c). Sie weist also für diese beiden Enzyme keine Schnittstelle auf. Dagegen führt die EcoRI/Xba I-Spaltung zu einer Bande, die aus der größten EcoRI-Bande entstanden sein muß, da sie größer ist als die zweite EcoRI-Bande. Eine zusätzliche Sal I-Verdauung führt dann zum Verschwinden der größten EcoRI/Xba I-Bande. Insgesamt ergibt sich also, daß die größte EcoRI-Bande mindestens eine Xba I-Schnittstelle aufweist und daß sich im größten der daraus entstehenden EcoRI/Xba I-Fragmente eine Sal I-Schnittstelle befindet. Da Fig.22 C zeigt, daß auch das größte BamHI-Fragment eine Sal I-Stelle trägt, und da aus Fig. 22 B Bahn b und c sowie aus Fig.22 C Bahn a und b hervor geht, daß in dem hier untersuchten Mitochondriengenom nur eine einzige Sal I-Schnittstelle enthalten ist, kann man schließen, daß das größte EcoRI- und das größte BamHI-Fragment sich auf der mtDNA überlappen. Anhand der Gelbilder in den Fig.22-26 ist es sogar möglich, die gegenseitige Orientierung dieser beiden, wie auch die einiger anderer wie z.B. der um die beiden Xho I-Schnittstellen herum gelegener, Fragmente festzulegen.

Die Auswertung von Fig.22-26 ergab einmal die in Tab.9 zusammengefaßten Daten hinsichtlich des Vorhandenseins bestimmter Restriktionsschnittstellen in den verschiedenen, bezüglich ihrer Größe definierten mtDNA-Restriktionsfragmenten. Zum anderen ergaben sich die folgenden wichtigen Erkenntnisse:

8								
Eco RI	Sal I	Xho I	Bam HI	Hind III	Cla I	Bgl II	Hinc II	Xba I
RR 1	+	+	+	+	+	-	+	+
RR 2	-	-	+	-	+	+	+	-
RR 3	-	-	+	-	-	+	+	+
RR 4	-	+	+	+	-	+	-	+
RR 5	-	-	+	+	+	+	+	-
RR 6	-	-	-	-	-	-	-	+
RR 7	-	-	-	-	-	-	-	-
RR 8	-	-	-	-	-	-	-	-

5								
Bam HI	Sal I	Xho I	Eco RI	Hind III	Cla I	Bgl II	Hinc II	Xba I
BB 1	+	+	+	+	+	+	+	+
BB 2	-	+	+	+	-	+	+	+
BB 3	-	-	+	-	+	+	+	-
BB 4	-	-	+	-	-	+	+	-
BB 5	-	-	+	+	+	-	-	-

12								
Hinc II	Sal I	Xho I	Bam HI	Hind III	Cla I	Bgl II	Eco RI	Xba I
HH 1	-	+	+	+	-	+	+	+
HH 2	+	-	-	-	-	-	-	+
HH 3	-	-	-	-	-	-	-	-
HH 4	-	-	+	-	+	-	-	-
HH 5	-	-	+	+	+	+	+	+
HH 6	-	+	-	-	+	-	-	+
HH 7	-	-	-	-	-	+	+	-
HH 8	-	-	+	-	-	-	-	-
HH 9	-	-	-	+	-	-	-	-
HH 10	-	-	+	-	-	+	+	-
HH 11	-	-	-	-	-	-	-	-
HH 12	-	-	-	-	-	-	-	-
HH 13	-	-	-	-	+	-	-	-

6							
Xba I		Xho I	Bam HI	Hind III	Cla I	Bgl II	Hinc II
Sal I							Eco RI
SX 1		-	-	-	-	-	-
XX 1		-	+	+	+	+	+
XX 3		+	+	+	+	+	+
XX 4		-	-	-	-	-	+
XS 2		-	-	+	-	-	+
XX 5		+	-	-	-	-	+

Tab.9 Auftreten zusätzlicher Restriktionsschnittstellen in bestimmten Restriktionsfragmenten von SC 167 mtDNA .

Auswertung der Agarose-Gelelektrophoresen von Einfach- und Mehrfach-Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA.

- (i) Die SC 167 mtDNA enthält nur eine einzige Sal I-Schnittstelle . Dies erlaubt es , einen eindeutigen Nullpunkt im ringförmigen Genom festzulegen . Da diese einzelne Sal I-Schnittstelle auch in den Mitochondriengenomen anderer Hefen vorhanden ist , wird es dadurch möglich die physikalischen und Genkarten der verschiedenen mtDNA's in Bezug zu diesem Nullpunkt miteinander zu vergleichen .
- (ii) SC 167 mtDNA enthält nur zwei Xho I-Schnittstellen . Auch diese lassen sich gut als Fixpunkte zur Kartierung (s.o.) einsetzen .
- (iii) Das größte EcoR I-, das größte BamH I-, das größte Cla I-, das größte Bgl II- und das zweitgrößte Xba I-Fragment enthalten alle die oben genannte Sal I-Schnittstelle . Daraus folgt , daß alle genannten Fragmente sich teilweise überlagern .
- (iv) Die Mindestzahl , bzw. oberhalb einer Größendifferenz von etwa 600 bp die Gesamtzahl , der Restriktionsfragmente läßt sich für ein gegebenes Enzym oder Enzymkombination angeben . Sie ist in Tab.9 aufgeführt .

3.Größenbestimmung der Restriktionsfragmente.

Der nächste Schritt zur Restriktionskartierung der SC 167 mtDNA war die Größenbestimmung aller in den Fig.22-26 enthaltenen Restriktionsfragmente . Zusammen mit den in Tab.9 aufgeführten Daten kann man dann schon eine große Zahl eindeutiger Zuordnungen (Überlappungen , Nachbarschaften) vornehmen .

Zur Ermittlung der Größe der einzelnen DNA-Fragmente wurde das computergestützte Verfahren von Sederoff und Schaffer herangezogen (48). Eine theoretische Begründung des Ansatzes dieser Autoren ist in der zitierten Arbeit gegeben . An dieser Stelle soll lediglich auf die Vorzüge dieses gegenüber den

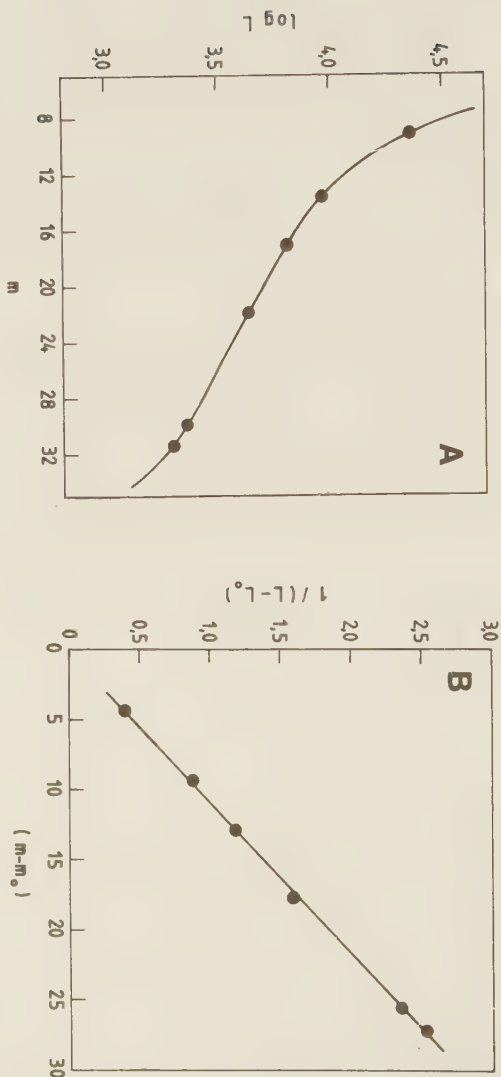


Fig. 27 Vergleich der Eichkurven zweier verschiedener Methoden zur Größenbestimmung von DNA-Restriktionsfragmenten.

HindIII-verdaute λ cI857-DNA wurde in 0.5% Agarosegelelektrophoretisiert und die Wanderungsstrecken der DNA-Fragmente an Vergrößerungen von Photografien der EtBr-gefärbten Gele bestimmt. Die Molekulargewichte der Restriktionsfragmente wurden aus (49) entnommen.

L = Molekulargewicht; m = Wanderungsstrecke; L_0 , m_0 = Korrekturfaktoren (s. Text).

STD LEN	DIST	PRED LEN	DEV	%
21240.0	6.000	21228.754	11.246	.053 105508.210
7420.0	13.300	7481.076	-61.076	-.823 104724.186
5810.0	16.090	5817.238	-7.238	-.125 105348.744
5650.0	16.500	5624.289	25.711	.455 105845.812
4880.0	18.480	4822.295	57.705	1.182 106445.606
3540.0	22.880	3567.576	-27.576	-.779 104861.197
MO = 1.32418 LO = -1324.63464 CBAR = 105455.62609				
SC = 637.94119 SD = 53.72876				
FOR A DIST OF 6.4500 PREDICT A LEN OF 19248.7739				
FOR A DIST OF 9.2300 PREDICT A LEN OF 12014.3488				

Tab. 10 Datenauszug zur computergestützten Größenbestimmung von DNA-Fragmenten.

Aus den Molekulargewichten (STD LEN) und den gemessenen Wanderungsstrecken (DIST) nach Elektrophorese von Standard DNA-Fragmenten werden die Korrekturfaktoren MO und LO vom Computer berechnet. Zur Kontrolle werden die mit diesen Faktoren berechneten Längen der Standard-Fragmente (PRED LEN), deren Abweichung von der vorgegebenen Länge, sowohl absolut (DEV) als auch in % (%), sowie die daraus errechnete Standardabweichung (SD) ausgedruckt. In den letzten Zeilen wird dann für die Wanderungsstrecke eines unbekannten DNA-Fragments (z.B. 6.45 cm) das vorausgesagte Molekulargewicht (hier 19248.77 kb) angegeben. Das benutzte Programm nach (48) ist in Material und Methoden aufgelistet.

sonst üblichen Verfahren hingewiesen werden. Fig. 27 A zeigt die üblicherweise für die graphische Auswertung von Elektrophogrammen herangezogene Auftragung von $\log L$ (L =Molekulargewicht) gegen m (m =Wanderungsstrecke) für die als Standard benutzten Hind III-Fragmente aus λ cI₈₇₅-DNA. Daneben (Fig. 27 B) ist zum Vergleich die vom Computer errechnete Eichgerade für eine Auftragung $1/(L-L_0)$ gegen $(m-m_0)$ gezeichnet. Dabei sind L_0 bzw. m_0 vom Computer berechnete Korrekturfaktoren für das Molekulargewicht und die Mobilität. Ein derartiger Computerausdruck ist in Tab. 10 gezeigt. Der aus Fig. 27 ersichtliche Unterschied ist offenkundig. Im ersten Fall (Fig. 27 A) wird durch die Eichpunkte willkürlich eine sigmoide Kurve gelegt, während die vom Computer errechnete Eichkurve eine Gerade ist, die – falls erwünscht – es auch ermöglicht, bezüglich der Berechnung Fehlergrenzen anzugeben. Dies ist bei der graphischen Auswertung nicht möglich. Auch ist es möglich, die errechnete Eichgerade zu extrapolieren, was bei der Charakterisierung besonders großer Fragmente mitunter nötig war. Der größte Vorteil einer maschinellen Berechnung der Fragmentlängen liegt aber in der Bewältigung eines großen Datenmaterials in relativ kurzer Zeit.

Es hatte sich zu Beginn der Arbeit gezeigt, daß das Verfahren, in einer separaten Tasche eines Agarosegels einen Größenstandard mitlaufen zu lassen und daraus dann graphisch die Größen der Fragmente in den anderen Bahnen zu bestimmen, zu Fehlern größer als 10% führte. Die Ursache ist neben der Unzulänglichkeit der graphischen Auswertung auch in den Eigenschaften des Agarosegels zu suchen. In den Gelbildern sind oft die Startpunkte der Elektrophorese nicht eindeutig zu bestimmen und Inhomogenitäten des Gels führen zu unterschiedlichem Laufverhalten, sowohl zwischen einzelnen Bahnen, als auch innerhalb ein und derselben Bahn. Solche Schwierigkeiten werden dadurch umgangen, daß zu jeder einzelnen Verdauung das Standardfragment-Gemisch beigelegt wird. Dadurch konnte jede Bahn eines Gels einzeln anhand eines internen Standards ausgewertet werden. Zudem wurden für jede Größenbestimmung mehr-

abcdefghijklmnop



Fig.28 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente.

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 15 µl verdaut, mit 0.3 µg restriktionsgespaltener λci 857 Marker-DNA in einem Volumen von 2 µl gemischt und in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

Marker: λci 857 -DNA EcoR1 gespalten.

mtDNA-Restriktionsspaltungen: EcoR1/Sal I (a), EcoR1/Xba I/Sal I (b), BamH1/EcoR1/Xba I/Sal I (c), EcoR1/BamH1/Sal I (d), BamH1/Xba I/Sal I (e), BamH1/Sal I (f), BamH1/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), EcoR1/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I/Sal I (j), BamH1/Hind III/Sal I (k), EcoR1/Sal I/Bgl II (l), Hinc II (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), EcoR1/Hind III/Sal I (o), KL14-4A mtDNA EcoR1/Hind III/Sal I (p).

a b c d e f g h i j k l m n o p

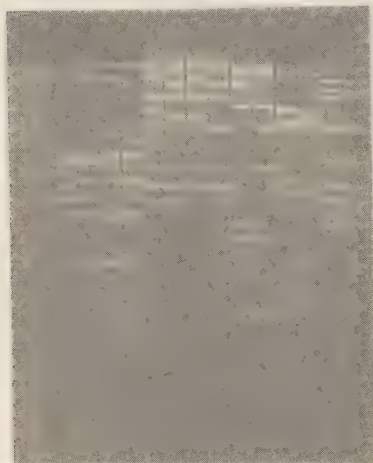


Fig.29 Restriktionsspaltungen von SC167 mtDNA zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente.

Je 0.5 µg SC167 mtDNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 15 µl verdaut, mit 0.3 µg, in einem Volumen von 2 µl, restriktionsgespaltener λcI 857 Marker-DNA gemischt und in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

Marker: λcI 857-DNA Hind III gespalten.

mtDNA-Restriktionsspaltungen: Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Xho I (b), Hinc II/Xho I (c), Hinc II (d), Hinc II/Eco RI (e), Hinc II/Xba I (f), Bam HI/Sal I (g), Bam HI/Sal I/Xho I (h), Bam HI/Hind III/Sal I (i), Bam HI/Hind III/Sal I/Xho I (j), Eco RI/Hind III/Sal I (k), Eco RI/Hind III/Sal I/Xho I (l), Eco RI/Bam HI/Sal I (m), Eco RI/Bam HI/Sal I/Xho I (n), Bam HI/Xba I/Sal I (o), Bam HI/Xba I/Sal I/Xho I (p).

a b c d e f g h i j k l m n o p



Fig.30 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente.

Je 0.5 μ g SC 167 mtDNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 15 μ l verdaut, mit 0.3 μ g (in einem Volumen von 2 μ l) restriktionsgespaltener λ cI 857 Marker-DNA gemischt und in einem 0.5% Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

Marker: λ cI 857-DNA Hind III gespalten.

mtDNA-Restriktionsspaltungen: Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Xba I/Sal I (b), Bam HI/Xba I/Eco RI/Sal I (c), Eco RI/Bam HI/Sal I (d), Bam HI/Xba I/Sal I (e), Bam HI (f), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Eco RI/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I (j), Bam HI/Hind III (k), Eco RI/Sal I/Bgl II (l), Hinc II (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco RI/Hind III/Sal I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Sal I (p).

a b c d e f g h i j k l m n o p

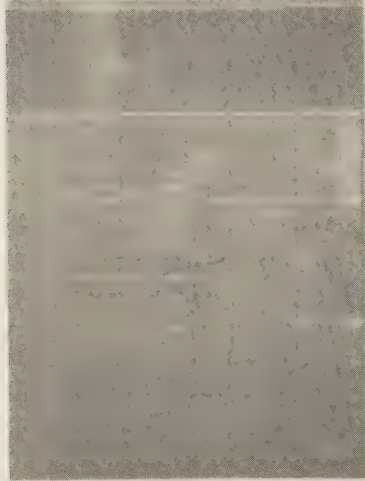


Fig.31 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente .

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 15 µl verdaut, mit 0.3 µg (in einem Volumen von 2 µl) restriktionsgespaltener λ cl 857 Marker-DNA gemischt und in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

Marker : λ cl 857-DNA Hind III gespalten.

mtDNA-Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Bgl II/Xho I (b), Hinc II (c), Hinc II/Bam HI (d), Hinc II/Bam HI/Xho I (e), Hinc II/Eco RI/Xho I (f), Hinc II/Xba I (g), Hinc II/Bgl II (h), Cla I/Sal I/Bgl II/Xho I (i), Eco RI/Cla I/Sal I/Xho I (j), Eco RI/Xba I/Sal I/Xho I (k), Bam HI/Sal I/Xho I (l), Bam HI/Xba I/Sal I (m), Eco RI/Hind III/Sal I (n), Hind III/Xba I/Sal I/Xho I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).

a b c d e f g h i j k l m n o p



Fig.32 Restriktionsspaltungen von SC 167 mtDNA zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente.

Je 0.5 µg SC 167 mtDNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 15 µl verdaut, mit 0.3 µg (in einem Volumen von 2 µl) restriktionsgespaltener λ cI 857 Marker-DNA gemischt und in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

Marker : λ cI 857-DNA Hind III gespalten.

mtDNA-Restriktionsspaltungen : Eco RI / Sal I (a), Eco RI / Xba I / Sal I (b), Bam HI / Xba I / Eco RI / Sal I (c), Eco RI / Bam HI / Sal I (d), Bam HI / Xba I / Sal I (e), Bam HI / Sal I (f), Bam HI / Xba I / Sal I / Cla I (g), Xba I / Cla I / Sal I (h), Eco RI / Cla I / Sal I (i), Hind III / Xba I (j), Bam HI / Hind III / Sal I (k), Eco RI / Sal I / Bgl II (l), Hinc II (m), Cla I / Sal I / Bgl II (n), Eco RI / Hind III / Sal I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI / Hind III / Sal I (p).

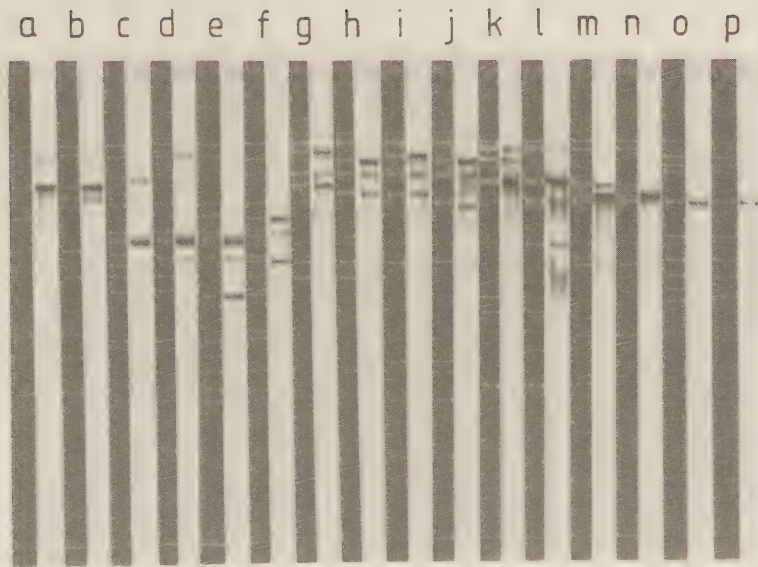


Fig.33 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem KL14-4A mtDNA Eco RI/Eco RI-Fragment RR 3 (vgl.Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Xho I (b), Hinc II/Xho I (c), Hinc II (d), Hinc II/Eco RI (e), Hinc II/Xba I (f), Bam HI/Sal I (g), Bam HI/Sal I/Xho I (h), Bam HI/Hind III/Sal I (i), Bam HI/Hind III/Sal I/Xho I (j), Eco RI/Hind III/Sal I (k), Eco RI/Sal I/Hind III/Xho I (l), Eco RI/Bam HI/Sal I (m), Eco RI/Bam HI/Sal I/Xho I (n), Bam HI/Xba I/Sal I (o), Bam HI/Xba I/Sal I/Xho I (p).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

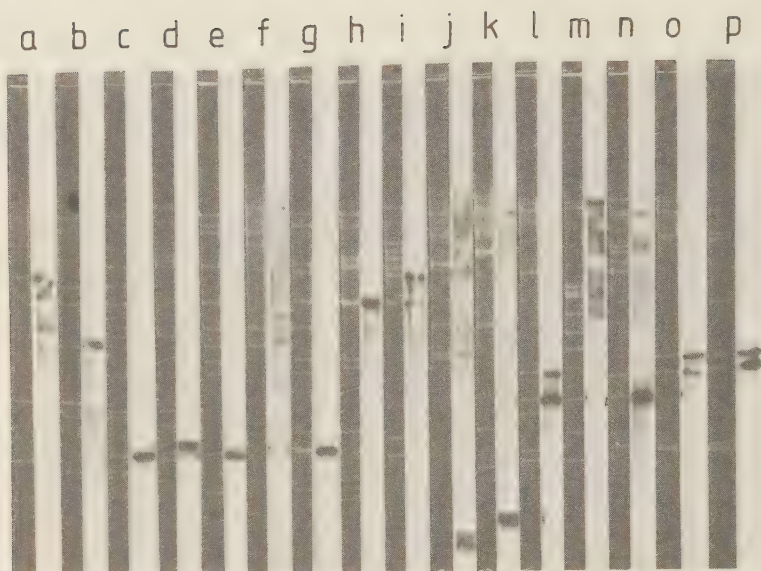


Fig.34 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Bam HI/Xba I-Fragment BX 3 (vgl.Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Xba I/Sal I (b), Bam HI/Xba I/Eco RI/Sal I (c), Eco RI/Bam HI/Sal I/Xho I (d), Bam HI/Xba I/Sal I (e), Bam HI/Sal I (f), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Eco RI/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I (j), Bam HI/Hind III/Sal I (k), Eco RI/Sal I/Bgl II (l), Hinc II (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco RI/Hind III/Sal I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

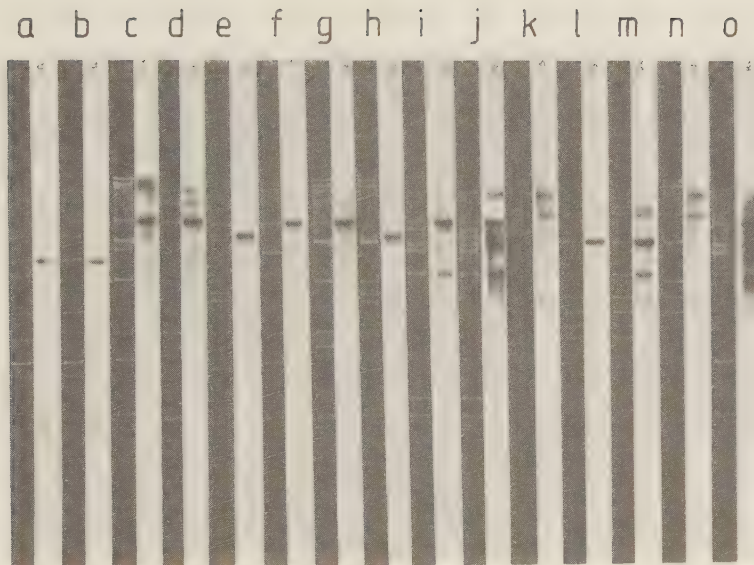


Fig.35 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Eco RI/Eco RI-Fragment RR 3 (vgl.Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Xba I/Sal I (a), Eco RI/Xba I (b), Eco RI (c), Eco RI/Hind III (d), Eco RI/Bam HI (e), Eco RI (f), Eco RI/Hind III/Sal I (g), Eco RI/Bam HI (h), Eco RI/Cla I (i), Eco RI/Cla I/Sal I (j), Bam HI (k), Bam HI/Xba I (l), Bam HI/Xba I/Sal I (m), Bam HI (n), KL14-4A mtDNA Eco RI (o).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

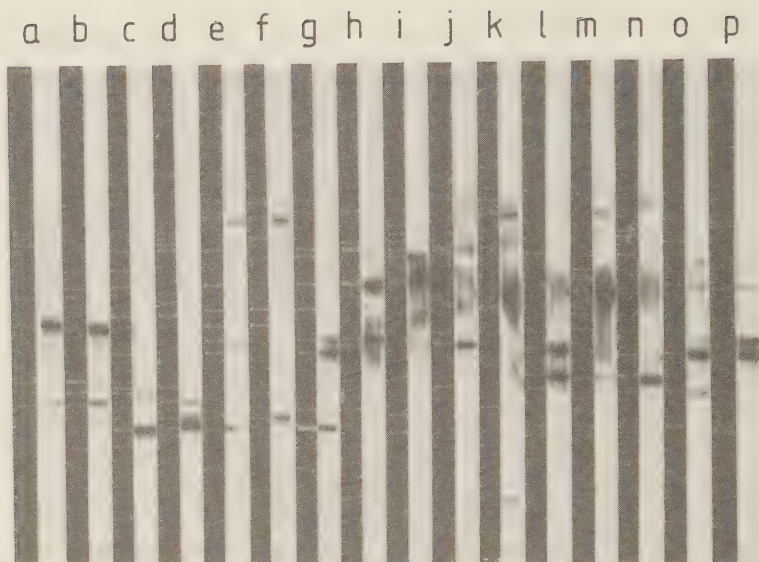


Fig.36 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem KL14-4A mtDNA Eco RI/Eco RI-Fragment RR 5 (vgl. Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I/Xho I (a), Eco RI/Sal I/Xba I/Xho I (b), Bam HI/Xba I/Sal I (c), Eco RI/Bam HI/Sal I/Xho I (d), Bam HI/Xba I/Sal I (e), Bam HI/Sal I/Xho I (f), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Eco RI/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I/Xho I (j), Bam HI/Hind III/Sal I/Xho I (k), Eco RI/Sal I/Bgl II (l), Hinc II/Xho I (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco RI/Hind III/Sal I/Xho I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

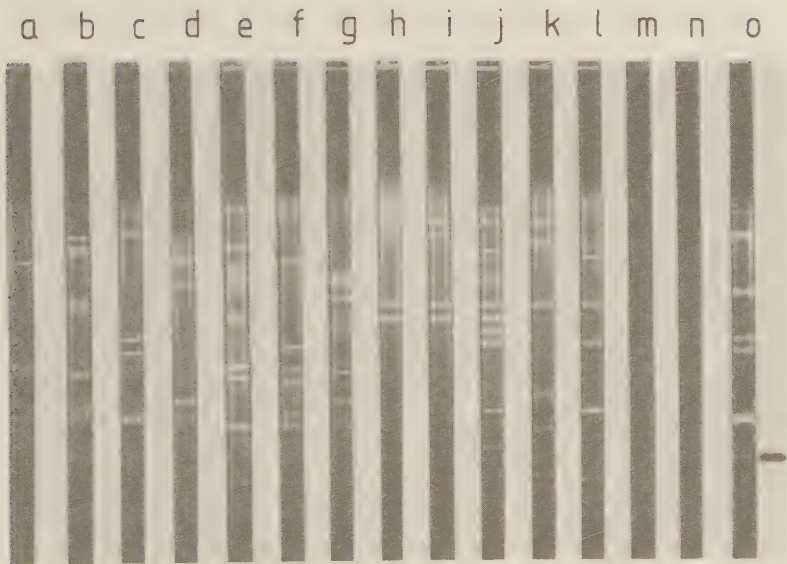


Fig.37 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem KL14-4A mtDNA Eco RI/Eco RI-Fragment RR 8 (vgl. Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Bam HI (b), Eco RI/Sal I/Hind III (c), Eco RI/Sal I/Cla I (d), Eco RI/Sal I/Xba I (e), Eco RI/Sal I/Bgl II (f), Hinc II (g), Bam HI (h), Bam HI/Sal I (i), Bam HI/Sal I/Xba I (j), Bam HI/Sal I/Hind III (k), Bam HI/Sal I/Cla I (l), Bam HI/Sal I/Xba I/Eco RI (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Xba I/Hind III/Sal I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

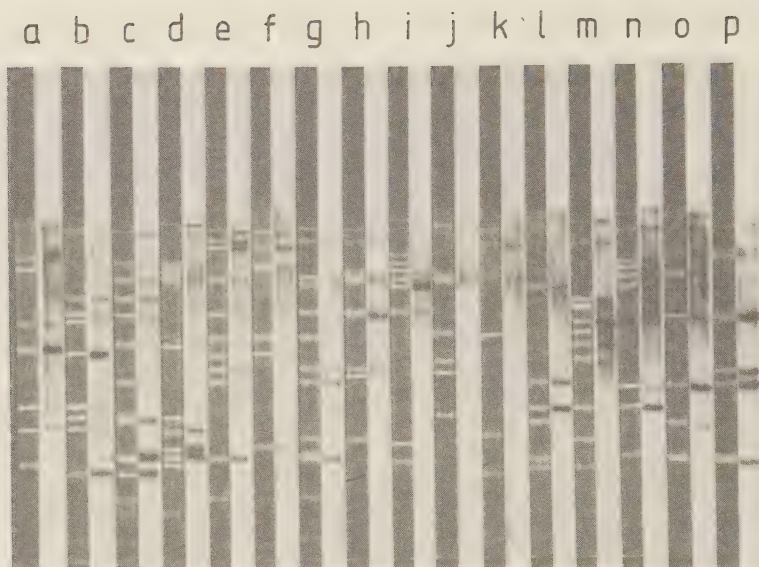


Fig.38 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem KL14-4A mtDNA Eco RI/Eco RI-Fragment RR 4 (vgl.Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I/Xho I (a), Eco RI/Sal I/Xba I/Xho I (b), Bam HI/Xba I/Sal I (c), Eco RI/Bam HI/Xba I/Xho I (d), Bam HI/Xba I/Sal I (e), Bam HI/Sal I/Xho I (f), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Sal I/Cla I (h), Eco RI/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I/Xho I (j), Bam HI/Hind III/sal I/Xho I (k), Eco RI/Sal I/Bgl II (l), Hinc II/Xho I (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco RI/Hind III/Sal I/Xho I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

a b c d e f g h i j k l m n o

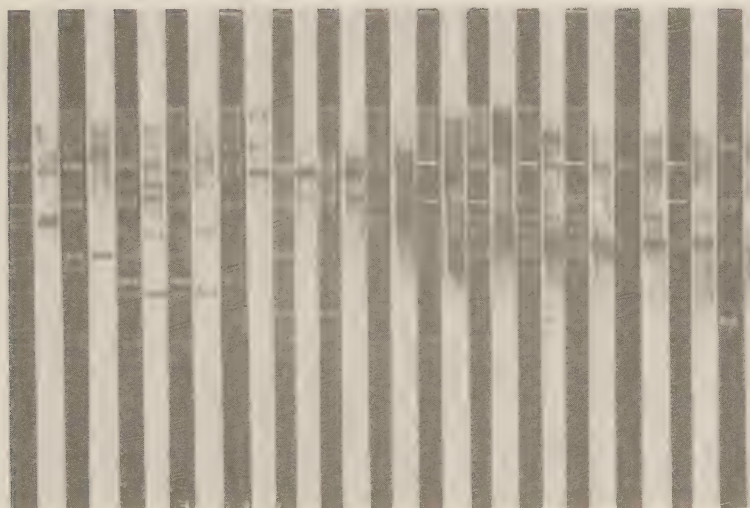


Fig.39 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Xba I/Xba I-Fragment XX 5 (vgl.Fig.47).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Bam HI (a), Eco RI/Hind III (b), Eco RI/Xba I/sal I (c), Eco RI/Xba I (d), Eco RI (e), Eco RI/Cla I (f), Eco RI/Cla I/Sal I (g), Bam HI/Hind III/Sal I (h), Bam HI/Hind III (i), Bam HI (j), Bam HI/Xba I (k), Bam HI/Xba I/Sal I (l), Xba I/Hind III (m), Xba I/Hind III/Sal I (n), K114-4A mtDNA Eco RI/Hind III/sal I (o).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

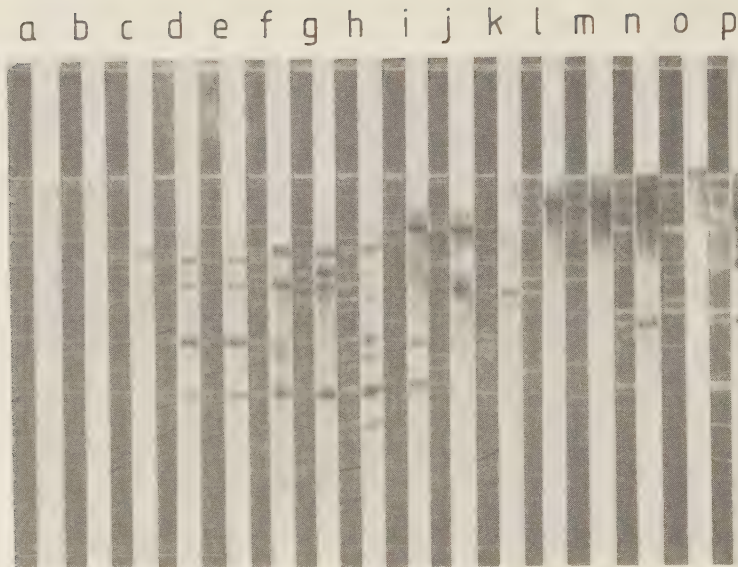


Fig.40 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Bam HI/Bam HI-Fragment BB 3 (vgl.Fig.47).

Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Bgl II/Xho I (b), Hinc II (c), Hinc II/Bam HI (d), Hinc II/Bam HI/Xho I (e), Hinc II/Eco RI/Xho I (f), Hinc II/Xba I (g), Hinc II/Bgl II (h), Cla I/Sal I/Bgl II/Xho I (i), Eco RI/Sal I/Cla I/Xho I (j), Eco RI/Xba I/Sal I/Xho I (k), Bam HI/Sal I/Xho I (l), Bam HI/Xba I/Sal I (m), Eco RI/Hind III/Sal I (n), Hind III/Xba I/Sal I/Xho I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

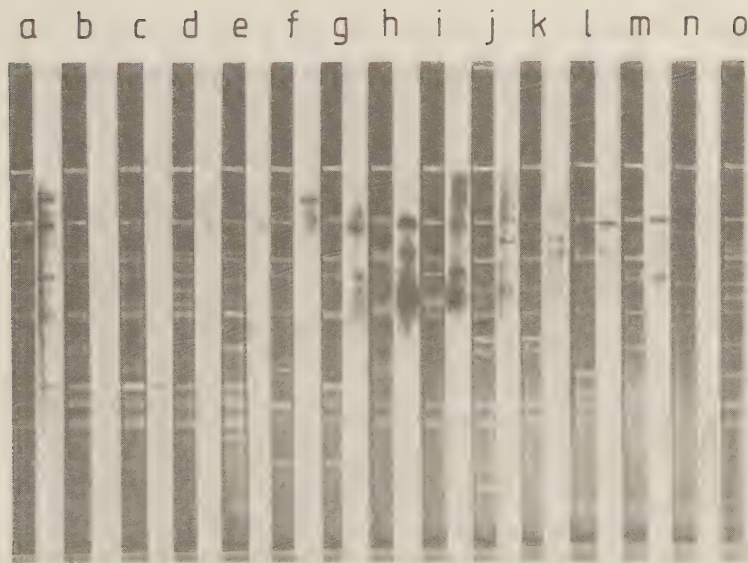


Fig.41 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Cla I/Cla I-Fragment CC 4 (vgl. Fig.47).

Restriktionsspaltungen : Bam HI/Xba I (a), Bam HI/Xba I/Eco RI (b), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (c), Bam HI/Xba I/Sal I (d), Bam HI/Xba I/Sal I/Eco RI (e), Bam HI/Hind III/Sal I (f), Bam HI/Cla I/Sal I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Hind III/Xba I (i), Eco RI/Xba I (j), Eco RI/Xba I/Sal I (k), Eco RI/Cla I/Sal I (l), Eco RI/Bam HI/Sal I (m), Eco RI/Sal I/Bgl II (n), Hinc II (o).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

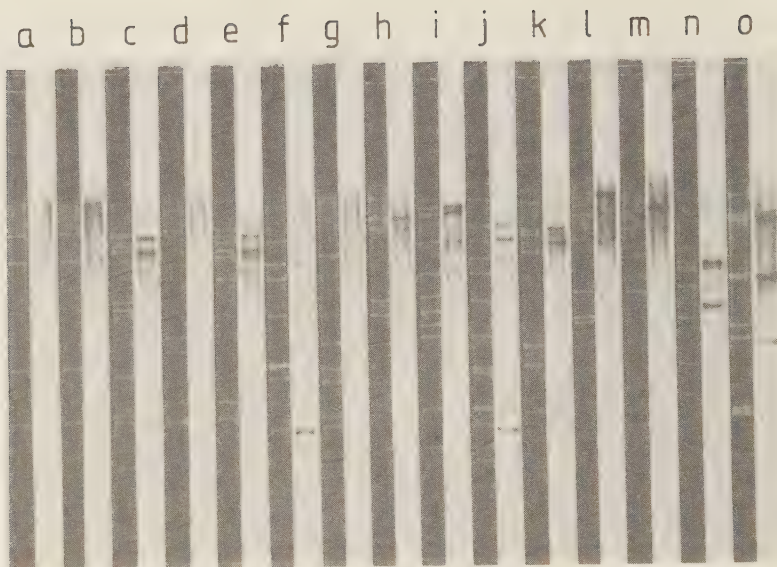


Fig.42 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit den SC 167 mtDNA Bam HI/Xba I-Fragmenten XB 1 und BB 3 (vgl.Fig.47).
Restriktionsspaltungen : Eco RI (a), Eco RI/Sal I (b), Eco RI/Sal I/Bam HI (c), Eco RI/Sal I/Hind III (d), Eco RI/Sal I/Cla I (e), Eco RI/Sal I/Xba I (f), Eco RI/Sal I/Bgl II (g), Bam HI/Sal I (h), Bam HI/Sal I/Xba I (i), Bam HI/Sal I/Xba I/Eco RI (j), Cla I/Sal I/Bgl II (k), Xba I/Hind III/Sal I (l), Bam HI/Hind III/Sal I (m), Hinc II (n), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (o).
Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

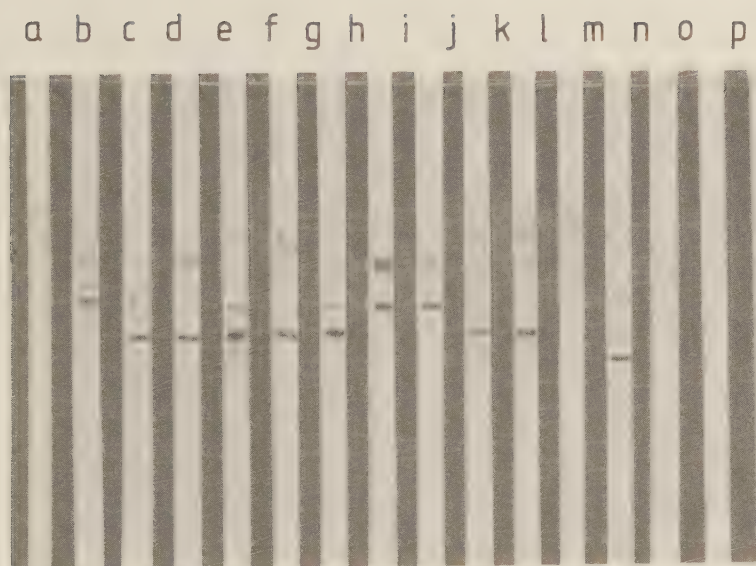


Fig.43 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Bam HI/Bam HI-Fragment BB 4 (vgl.Fig.47).
Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Xba I/Sal I (b), Bam HI/Xba I/Eco RI/Sal I (c), Eco RI/Bam HI/Sal I/Xho I (d), Bam HI/Xba I/Sal I (e), Bam HI/Sal I (f), Bam HI/Xba I/Sal I/Cla I (g), Xba I/Cla I/Sal I (h), Eco RI/Cla I/Sal I (i), Hind III/Xba I (j), Bam HI/Hind III/Sal I (k), Eco RI/Sal I/Bgl II (l), Hinc II (m), Cla I/Sal I/Bgl II (n), Eco RI/Hind III/Sal I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).
Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

a b c d e f g h i j k l m n o p

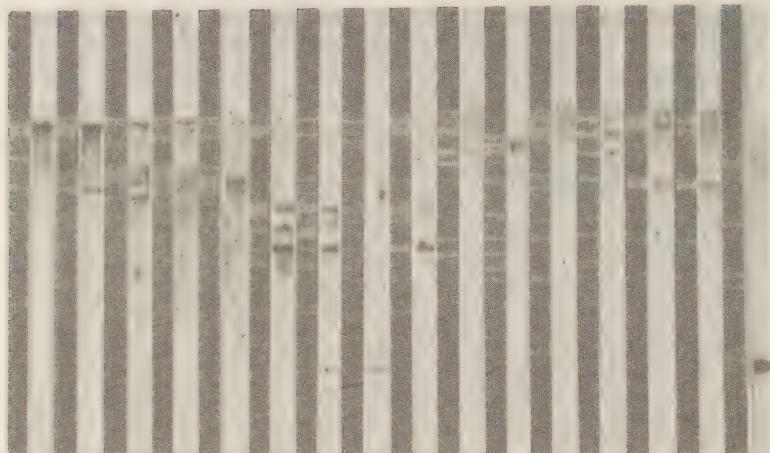


Fig.44 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem KL14-4A mtDNA Hind III/Eco RI-Fragment DR 10 (vgl.Fig.49).
 Restriktionsspaltungen : Eco RI/Sal I (a), Eco RI/Sal I/Bgl II (b), Cla I/Sal I/Bgl II/Xho I (c), Cla I/Sal I/Bgl II (d), Cla I/Sal I/Bgl II/Hind III (e), Hinc II (f), Hinc II/Xba I (g), Hinc II/Bgl II (h), Hinc II/Cla I (i), Bam HI/Sal I (j), Bam HI/Xba I/Sal I (k), Bam HI/Cla I/Sal I (l), Hind III/Xba I/Sal I (m), Hind III/Cla I/Sal I (n), Hind III/Cla I/Sal I/Xho I (o), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III/Sal I (p).
 Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

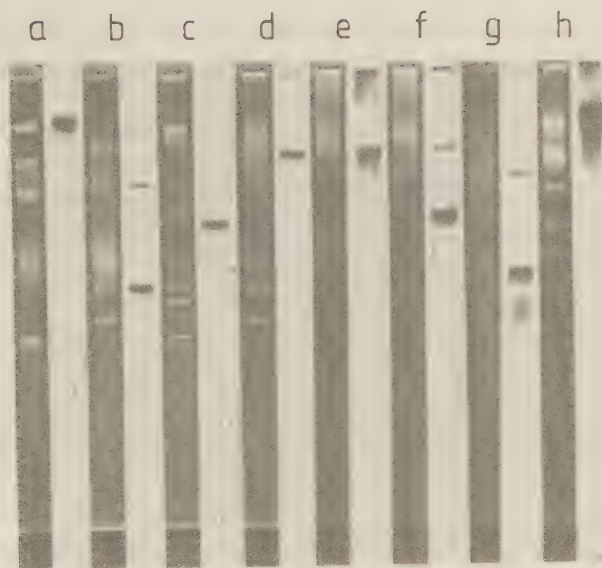


Fig.45 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III-Fragment RD 7 (vgl.Fig.49).

Restriktionsspaltungen : Hinc II (a), Bam HI/Eco RI (b), Hind III Eco RI (c), Eco RI (d), KL14-4A mtDNA Eco RI (e), KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III (f), KL14-4A mtDNA Eco RI/Bam HI (g), KL14-4A mtDNA Hinc II (h).

Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

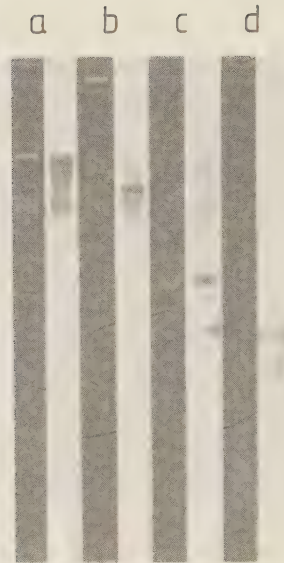


Fig.46 "Southern-blot" Hybridisierung von restriktions-
gespaltener SC 167 mtDNA .

EtBr-gefärbte Agarosegele und Autoradiogramme der zugehörigen "Southern-blot" Hybridisierung mit dem SC 167 mtDNA Eco R1/Eco R1-Fragment RR 4 (vgl.Fig.47).
Restriktionsspaltungen : Hinc II (a), Hinc II/Eco R1 (b),
Hinc II/Bam H1 (c), Hinc II/Pvu I (d).
Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

sind, führen bei der Elution eines Fragmentes aus einem präparativen Agarosegel auch zur gleichzeitigen Elution fremder DNA-Sequenzen, die sich dann u.U. später bei der "Southern-blot"-Hybridisierung als störende oder irreführende Kreuzhybridisierungen bemerkbar machen können. Darüberhinaus enthält mtDNA über das ganze Genom verstreut GC-Cluster und AT-reiche Sequenzen sowie zahlreiche Sequenzhomologien, z.B. im Bereich der ori-Sequenzen. Auch diese können zu Kreuzhybridisierungen mit nicht-homologen Fragmenten führen. Es zeigte sich jedoch, daß die spezifische Hybridisierung zwischen homologen Sequenzen meist zu deutlich stärkeren Schwärzungen führte als die unspezifischen Kreuzhybridisierungen. Wo dies nicht der Fall war, konnten in Verbindung mit den oben gesammelten Daten meist trotzdem eindeutige Zuordnungen getroffen werden. In den Fig.33-46 sind die Autoradiogramme der durchgeführten "Southern blot"-Hybridisierungen gezeigt. Dabei ist jeder Bahn des Autoradiogramms die entsprechende Bahn des ursprünglichen EtBr-gefärbten Gels zugeordnet.

Die Daten dieser Hybridisierungen zusammen mit den oben erhaltenen Restriktionsmustern und den Größenbestimmungen erlaubten es schließlich, die vollständige Restriktionskarte des Stammes SC 167 aufzustellen. Wie dabei im einzelnen vorgegangen wurde soll an einem Beispiel verdeutlicht werden.

Fig.34 zeigt die "Southern-blot" Hybridisierungen von, in Einzel- und Mehrfach-Verdauungen restriktionsgespaltener SC 167 mtDNA sowie Eco R1/Hind III/Sal I-gespaltener KL14-4A mtDNA mit dem ³²P-markierten Bam H1/Xba I-Fragment BX 3 aus SC 167 mtDNA. Bahne zeigt die Hybridisierung dieses Fragmentes mit sich selbst. Da die mtDNA-Genkarte des Stammes KL14-4A bereits bekannt ist, kann man aus der Hybridisierung mit den Banden 7 und 8 der Eco R1/Hind III/Sal I-Verdauung von KL14-4A mtDNA in Bahn p (entsprechend den Fragmenten DR 6 und RD 7) ablesen, daß Fragment BX 3 aus SC 167 mtDNA einen Teil des OXI 3-Gens repräsentiert (vgl.Fig.49). Zwei ähnlich große hybridisierende Fragmente erscheinen auch in der Eco R1/Hind III/Sal I-Verdauung von SC 167 mtDNA (Banden 5 und 6 in Bahn o entsprech-

end den Fragmenten DR 2 und RD 3, vgl. Fig. 47 und Tab. 11). Ein Vergleich mit der Hybridisierung der fünften Bande in Bahn a (RR 4) zeigt einmal, daß eine Hind III-Schnittstelle in RR 4 (vgl. Tab. 9) die genannten Eco RI/Hind III-Fragmente erzeugt und zum anderen, daß Fragment BX 3 vollständig in RR 4 eingebettet ist. Bahn b zeigt, daß es auch vollständig in RX 3 liegt. Die Hybridisierungen mit jeweils einer Bande in den Bahnen a, f und m zeigen, daß sich die Fragmente RR 4, BB 2 und HH 1 überlappen. Aus den Hybridisierungen mit RR 4 (a), RX 3 (b) und BB 2 (f) können zusammen mit den Größen der entsprechenden Fragmente die Positionen der Bam HI- und der Xba I-Schnittstelle in Fragment RR 4 festgelegt werden. Weiter liefert Bahn h die Cla I-Schnittstelle links von RR 4. Insgesamt kann man anhand dieses Autoradiogramms zusammen mit der Kenntnis der Restriktionsschnittstellen und der Größe der Restriktionsfragmente die Positionen von zwei Eco RI-, zwei Bam HI-, einer Xba I-, einer Xho I-, einer Cla I-, einer Hind III- und einer Bgl II-Schnittstelle im Bereich des OXI 3-Gens von SC 167 mtDNA festlegen.

Tab.11 Restriktionsanalyse von SC 167 und KL14-4A mtDNA.

mtDNA von *S.cerevisiae* SC 167 wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Bam HI, Hind III, Hinc II, Xba I, Cla I, Bgl II, Xho I und Sal I oder Kombinationen dieser Enzyme erschöpfend verdaut und auf 0.5% Agarosegelele analysiert. Verdauung, Elektrophorese und Größenbestimmung wurden wie in Material und Methoden angegeben durchgeführt. Die Nomenklatur der Restriktionsfragmente folgt den Vorschlägen von Sanders et.al.(6). Die Verdauungen sind alphabetisch geordnet ausgehend von den Schlüsselenzymen Bam HI, Eco RI, Hinc II und Hind III. Für die Doppelverdauungen mit Sal I oder Xho I sind nur die jeweils betroffenen Fragmente aufgelistet.

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
Bam HI				Bam HI / Cla I / Sal I			
1	42,740	BB 1	74.2-31.5	1	31,210	SC 1	0 -31.2
2	18,590	BB 2	44.7-63.3	2	18,590	BB 2	44.7-63.3
3	13,260	BB 3	31.5-44.7	3	9,780	CS 2	75.7-85.5
4	5,760	BB 4	68.5-74.2	4	8,880	BC 1	31.4-40.3
5	5,150	BB 5	63.3-68.5	5	5,760	BB 4	68.5-74.2
Bam HI / Sal I				6	4,380	CB 2	40.3-44.7
31,450	SB 1	0 -31.5		7	2,610	CB 3	65.8-68.5
11,290	BS 2	74.2-85.5		8	2,540	BC 4	63.3-65.8
				9	1,510	BC 5	74.2-75.7
				10	240	CB 6	31.2-31.4

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
Bam HI / Hind III / Sal I				Bam HI / Xba I / Sal I / Xho I			
1	31,450	SB 1	0 -31.5	6	5,760	BB 4	68.5-74.2
2	17,200	DB 1	46,1-63.3	7	5,150	BB 5	63.3-68.5
3	13,260	BB 3	31.5-44.7	8	4,690	XX 5	47.3-52.0
4	10,210	BD 2	74.2-84.4	9	4,370	BX 2	74.2-78.6
5	5,760	BB 4	68.5-74.2	10	2,580	BX 3	44.7-47.3
6	2,920	BD 3	63.3-66.2	11	1,960	XB 7	61.3-63.3
7	2,230	DB 4	66.2-68.5	Bam HI / Xba I / Sal I / Xho I			
8	1,390	BD 5	44.7-46.1	1	4,590	XhX 2	47.4-52.0
9	540	DD 4	84.4-85.0	2	3,460	XhX 3	75.1-78.6
10	540	DS 2	85.0-85.5	3	910	BXh 4	74.2-75.1
Bam HI / Xba I / Sal I				4	100	XXh 4	47.3-47.4
1	16,950	SX 1	0 -17.0	Bam HI / Sal I / Xho I			
2	14,500	XB 1	17.0-31.5	1	15,910	XhB 2	47.4-63.3
3	13,260	BB 3	31.5-44.7	2	10,380	XhS 2	75.1-85.5
4	9,360	XX 4	52.0-61.3	3	2,680	BXh 3	44.7-47.4
5	6,920	XS 2	78.6-85.5	4	910	BXh 4	74.2-75.1

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
Bam HI / Hind III / Sal I / Xho I							
1	15,910	XhB2	47.4-63.3	12	2,540	BC 4	63.3-65.8
2	9,300	XhD 2	75.1-84.4	13	1,960	XB 4	61.3-63.3
3	1,290	DXh 4	46.1-47.4	14	1,510	BC 5	74.4-75.7
4	910	BXh 4	74.2-75.1	15	240	CB 6	31.2-31.5
Bam HI / Cla I / Xba I / Sal I				Bam HI / Eco RI / Xba I / Sal I			
1	16,950	SX 1	0 -17.0	1	16,950	SX 1	0 -17.0
2	14,260	XC 1	17.0-31.2	2	11,210	RB 1	20.2-31.5
3	9,360	XX 4	52.0-61.3	3	9,870	BR 2	31.5-41.3
4	8,880	BC 1	31.5-40.3	4	7,890	RX 2	53.5-61.3
5	6,920	XS 2	78.6-85.5	5	6,920	XS 2	78.6-85.5
6	5,760	BB 4	68.5-74.2	6	5,550	RB 5	68.7-74.2
7	4,690	XX 5	47.3-52.0	7	4,370	BX 2	74.2-78.6
8	4,380	CB 2	40.3-44.7	8	3,470	RB 6	65.0-68.5
9	2,860	CX 4	75.7-78.6	9	3,300	XR 5	47.3-50.6
10	2,610	CB 3	65.8-68.5	10	2,620	RB 7	42.1-44.7
11	2,580	BX 3	44.7-47.3	11	2,580	BX 3	44.7-47.3
				12	2,410	XR 10	17.0-19.4
				13	1,960	XB 4	61.3-63.3

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
14	1,680	BR 8	63.3-65.0	Bg1 II / Cla I / Sal I			
15	1,390	RX 7	50.6-52.0	1	20,560	SBg 1	0 -20.6
16	1,100	XR 8	52.0-53.1	2	14,970	BgBg 3	46.4-61.8
17	880	RR 7	19.4-20.2	3	10,650	BgC 1	20.6-31.2
18	770	RR 8	41.3-42.1	4	9,780	CS 2	75.7-85.5
19	370	RR 9	53.1-53.5	5	9,120	CC 4	31.2-40.3
20	210	BR 9	68.5-68.7	6	8,390	BgC 2	67.3-75.7
Bg1 II				7	4,010	BgC 3	61.8-65.8
1	38,730	BgBg 1	67.3-20.6	8	3,530	BgBg 5	42.9-46.4
2	22,320	BgBg 2	20.6-42.9	9	2,550	CBg 4	40.3-42.9
3	14,970	BgBg 3	46.4-61.8	10	1,490	CBg 5	65.8-67.3
4	5,500	BgBg 4	61.8-67.3	Bg1 II / Cla I / Sal I / Xho I			
5	3,530	BgBg 5	42.9-46.4	1	14,440	XnBg 2	47.4-61.8
Bg1 II / Sal I				2	7,790	BgXh 3	67.3-75.1
1	20,560	SBg 1	0 -20.6	3	980	BgXh 4	46.4-47.4
2	18,170	BgS2	67.3-85.5	4	600	XhC 4	75.1-75.7

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
C1a I				Eco R1			
1	40,990	CC 1	75.7-31.2	8	770	RR 8	41.3-42.1
2	25,510	CC 2	40.3-65.8	9	370	RR 9	53.1-53.5
3	9,880	CC 3	65.8-75.7	Eco R1 / Sal I			
4	9,120	CC 4	31.2-40.3		19,360	SR 1	0 -19.4
C1a I / Sal I					16,840	RS 2	68.7-85.5
	31,210	SC 1	0 -31.2	Eco R1 / Bam HI / Sal I			
	9,780	CS 2	75.7-85.5	1	19,360	SR 1	0 -19.4
Eco R1				2	11,470	BS 2	74.0-85.5
1	36,200	RR 1	68.7-19.4	3	11,180	RB 1	20.1-31.5
2	21,080	RR 2	20.2-41.3	4	9,870	BR 2	31.5-41.3
3	11,530	RR 3	53.5-65.0	5	9,330	RB 3	53.5-63.3
4	8,500	RR 4	42.1-50.6	6	5,880	BR 4	44.7-50.6
5	3,680	RR 5	65.0-68.7	7	5,550	RB 5	68.7-74.0
6	2,490	RR 6	50.6-53.1	8	3,470	RB 6	65.0-68.5
7	880	RR 7	19.4-20.2	9	2,620	RB 7	42.1-44.7
				10	2,490	RR 6	50.6-53.1

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
11	1,680	BR 8	63.3-65.0	13	770	RR 8	41.3-42.1
12	880	RR 7	19.4-20.2	14	370	RR 9	53.1-53.5
13	770	RR 8	41.3-42.1	15	320	RBg 8	20.2-20.6
14	370	RR 9	53.1-53.5				
15	210	BR 9	68.5-68.7				
Eco RI / Bgl II / Sal I				Eco RI / Cla I / Sal I			
1	20,760	BgR 1	20.6-41.3	1	19,360	SR 1	0 -19.4
2	19,360	SR 1	0 -19.4	2	11,530	RR 3	53.5-65.0
3	16,840	RS 2	68.7-85.5	3	10,970	RC 1	20.2-31.2
4	8,380	RBg 2	53.5-61.8	4	9,780	CS 2	75.7-85.5
5	4,180	BgR 3	46.4-50.6	5	9,120	CC 4	31.2-40.3
6	3,530	BgBg 4	42.9-46.4	6	8,500	RR 4	42.1-50.6
7	3,150	BgR 4	61.8-65.0	7	7,060	RC 2	68.7-75.7
8	2,490	RR 6	50.6-53.1	8	2,820	CR 3	65.8-68.7
9	2,350	RBg 5	65.0-67.3	9	2,490	RR 6	50.6-53.1
10	1,330	BgR 6	67.3-68.7	10	990	CR 4	40.3-41.3
11	880	RR 7	19.4-20.2	11	880	RR 7	19.4-20.2
12	790	RBg 7	42.1-42.9	12	860	RC 5	65.0-65.8
				13	770	RR 8	41.3-42.1
				14	370	RR 9	53.1-53.5

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
Eco RI / Hind III / Sal I				Eco RI / Sal I / Xho I			
1	21,080	RR 2	20.2-41.3	2	16,950	SX 1	0 -17.0
2	19,360	SR 1	0 -19.4	3	9,920	RX 1	68.7-78.6
3	15,760	RD 1	68.7-84.4	4	7,890	RX 2	53.1-61.3
4	11,530	RR 3	53.5-65.0	5	6,920	XS 2	78.6-85.5
5	4,490	DR 2	46.1-50.6	6	5,200	RX 3	42.1-47.3
6	4,010	RD 3	42.1-46.1	7	3,680	RR 5	65.0-68.7
7	2,490	RR 6	50.6-53.1	8	3,640	XR 4	61.3-65.0
8	2,440	DR 4	66.2-68.7	9	3,300	XR 5	47.3-50.6
9	1,240	RD 5	65.0-66.2	10	2,410	XR 6	17.0-19.4
10	880	RR 7	19.4-20.2	11	1,390	RX 7	50.6-52.0
11	770	RR 8	41.3-42.1	12	1,100	XR 8	52.0-53.1
12	540	DD 4	84.4-85.0	13	880	RR 7	19.4-20.2
13	540	DS 2	85.0-85.5	14	770	RR 8	41.3-42.1
14	370	RR 9	53.1-53.5	15	370	RR 9	53.1-53.9
Eco RI / Xba I / Sal I							
1	21,080	RR 2	20.2-41.3		10,380	Xhs 2	75.1-85.5
					6,460	RXh 2	68.7-75.1
					5,300	RXh 3	42.1-47.4

Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
	3,200	Xhr 4	47.4-50.6

Eco RI / Bam HI / Sal I / Xho I

10,380	Xhs 2	75.1-85.5
3,200	Xhr 2	47.4-50.6
2,680	Bxh 3	44.7-47.4
910	Bxh 4	74.2-75.1

Eco RI / Bgl II / Sal I / Xho I

10.380	Xhs 2	75.1-85.5
6,460	Rxh 2	68.7-75.1
3,200	Xhr 4	47.4-50.6
980	BgXh 4	46.4-47.4

Eco RI / Hind III / Sal I / Xho I

9,300	Xhd 2	75.1-84.4
6,460	Rxh 2	68.7-75.1

Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
	3,200	Xhr 4	47.4-50.6
	1.200	DXh 4	46.1-47.4

Eco RI / Xba I / Sal I / Xho I

6,460	RXh 2	68.7-75.1
3,460	XhX 3	75.1-78.6
3,200	Xhr 4	47.4-50.6
100	XXh 4	47.3-47.4

Hinc II

1	19,260	HH 1	41.1-60.4
2	18,010	HH 2	0 -18.0
3	7,390	HH 3	23.3-30.7
4	7,070	HH 4	30.7-37.8
5	6,820	HH 5	60.4-67.2
6	6,040	HH 6	74.9-81.0
7	5,310	HH 7	18.0-23.3
8	4,780	HH 8	70.1-74.9

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
9	3,470	HH 9	82.0-85.5	13	1,690	BH 7	68.5-70.1
10	2,930	HH 10	67.2-70.1	14	1,240	HB 8	67.2-68.5
11	2,320	HH 11	37.8-40.1	15	1,070	HH 12	81.0-82.0
12	1,070	HH 12	81.0-82.0	16	1,030	HH 13	40.1-41.1
13	1,030	HH 13	40.1-41.1	17	740	HB 9	30.7-31.5
				18	710	BH 10	74.2-74.9
Hinc II / Bam HI				Hinc II / Bgl II			
1	18,010	HH 2	0 -18.0	1	18,010	HH 2	0 -18.0
2	15,680	BH 1	44.7.60.4	2	13,980	BGH 1	46.4-60.4
3	7,390	HH 3	23.3-30.7	3	7,390	HH 3	23.3-30.7
4	6,330	BH 2	31.5-37.8	4	7,070	HH 4	30.7-37.8
5	6,040	HH 6	74.9-81.0	5	6,040	HH 6	74.9-81.0
6	5,310	HH 7	18.0-23.3	6	5,380	BGH 2	61.8-67.2
7	4,070	HB 3	70.1-74.2	7	4,780	HH 8	70.1-74.9
8	3,910	BH 4	63.3-67.2	8	3,530	BGBG 5	42.9-46.4
9	3,580	HB 5	41.1-44.7	9	3,470	HH 9	82.0-85.5
10	3,470	HH 9	82.0-85.5	10	2,810	BGH 3	67.3-70.1
11	2,910	HB 6	60.4-63.3	11	2,760	BGH 4	20.6-23.3
12	2,320	HH 11	37.8-40.1				

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
12	2,550	HBg 5	18.0-20.6	11	2,320	HH 11	37.8-40.1
13	2,320	HH 11	37.8-40.1	12	1,370	CH 4	65.8-77.2
14	1,750	HBg 6	41.1-42.9	13	1,070	HH 12	81.0-82.0
15	1,440	HBg 7	60.4-61.8	14	800	HC 5	74.9-75.7
16	1,070	HH 12	81.0-82.0	15	800	CH 6	40.3-41.1
17	1,030	HH 13	40.1-41.1	16	500	HC 7	30.7-31.2
18	120	HBg 8	67.2-67.3	17	230	HC 8	40.1-40.3

Hinc II / Cla I				Hinc II / Eco RI			
1	19,260	HH 1	41.1-60.4	1	18,010	HH 2	0 -18.0
2	18,010	HH 2	0 -18.0	2	8,500	RK 4	42.1-50.6
3	7,390	HH 3	23.3-30.7	3	7,390	HH 3	23.3-30.7
4	6,570	CH 1	31.2-37.8	4	7,070	HH 4	30.7-37.8
5	5,450	CH 2	60.4-65.8	5	6,840	RH 1	53.5-60.4
6	5,310	HH 7	18.0-23.3	6	6,040	HH 6	74.9-81.0
7	5,240	CH 3	75.7-81.0	7	4,780	HH 8	70.1-74.9
8	4,780	HH 8	70.1-74.9	8	4,590	HR 2	60.4-65.0
9	3,470	HH 9	82.0-85.5	9	3,470	HH 9	82.0-85.5
10	2,930	HH 10	67.2-70.1	10	3,080	RH 3	20.2-23.3

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
11	2,490	RR 6	50.6-53.1	7	5,310	HH 7	18.0-23.3
12	2,320	HH 11	37.8-40.1	8	4,780	HH 8	70.1-74.9
13	2,230	RH 4	65.0-67.2	9	4,690	XX 5	47.3-52.0
14	1,480	RH 5	68.7-70.1	10	3,760	HX 5	74.9-78.6
15	1,450	HR 6	67.2-68.7	11	3,470	HH 9	82.0-85.5
16	1,350	HR 7	18.0-19.4	12	2,930	HH 10	67.2-70.1
17	1,070	HH 12	81.0-82.0	13	2,380	XH 6	78.6-81.0
18	1,030	HH 13	40.1-41.1	14	2,320	HH 11	37.8-40.1
19	880	RR 7	19.4-20.2	15	1,070	HH 12	81.0-82.0
20	770	RR 8	41.3-42.1	16	1,060	XH 7	17.0-18.0
21	370	RR 9	53.1-53.5	17	1,030	HH 13	40.1-41.1
22	190	HR 8	41.1-41.3	18	950	HX 8	60.4-61.3

Hinc II / Xba I				Hinc II / Xho I			
1	16,950	HX 1	0 -17.0		13,000	XHh 1	47.4-60.4
2	8,410	XH 2	52.0-60.4		6,260	HXh 2	41.1-47.4
3	7,390	HH 3	23.3-30.7		5,840	XHh 3	75.1-81.0
4	7,070	HH 4	30.7-37.8		200	HXh 4	74.9-75.1
5	6,160	HX 3	41.1-47.3				
6	5,870	XH 4	61.3-67.2				

Tab.11 (Fortsetzung)

Fragment				Fragment			
Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb	Nr.	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
Hinc II / Bam HI / Xho I				Hind III / Cla I / Sal I			
13,000		Xhh 1	47.4-60.4	1	31,210	SC 1	0 -31.2
5,840		Xhh 3	75.1-81.0	2	19,740	DC 1	46.1-65.8
2,680		BXh 3	44.7-47.4	3	9,500	DC 2	66.2-75.7
200		HXh 4	74.9-75.1	4	9,120	CC 4	31.2-40.3
Hinc II / Eco RI / Xho I				5	8,700	CD 3	75.7-84.4
5,840		Xhh 3	75.1-81.0	6	5,770	CD 4	40.3-46.1
5,300		RXh 3	42.1-47.4	7	540	DD 4	84.4-85.0
3,200		XhR 4	47.4-50.6	8	540	DS 2	85.0-85.5
200		HXh 4	74.9-75.1	9	380	CD 5	65.8-66.2
Hind III				Hind III / Xba I / Sal I			
1	46,640	DD 1	85.0-46.1	1	29,150	XD 1	17.0-46.1
2	20,120	DD 2	46.1-66.2	2	16,950	SX 1	0 -17.0
3	18,200	DD 3	66.2-84.4	3	12,360	DX 2	66.2-78.6
4	540	DD 4	84.4-85.0	4	9,360	XX 4	52.0-61.3
				5	5,840	XD 3	78.6-84.4
				6	4,880	XD 4	61.3-66.2

Tab.11 (Fortsetzung)

Nr.	Fragment		
	Länge bp	Bezeichnung	Position kb
KL14-4A mtDNA			
Eco RI/Hind III/Sal I			
1	21,000	RR 2	20.6-41.6
2	16,350	RD 2	71.0-87.3
3	11,890	RR 3	55.4-67.3
4	11,210	SR 2	0 -11.2
5	6,400	RD 5	11.2-17.6
6	4,460	DR 6	46.7-51.1
7	4,100	RD 7	42.6-46.7
8	2,500	RR 7	51.1-53.6
9	2,440	DR 9	68.6-71.0
10	2,400	DR 10	17.6-20.6
11	1,780	RR 8	53.6-55.4
12	1,300	RD 12	67.3-68.6
13	1,080	RR 9	41.6-42.6



Fig.47 Restriktionskarte der mitochondriellen DNA des
S.cerevisiae Stammes SC 167 .

Die Restriktionskarte des Hefestammes SC 167 in Bezug auf die Restriktionsenzyme Eco RI, Bam HI, Hind III, Hinc II, Xba I, Cla I, Bgl II, Xho I und Sal I wurde in Kombination der Daten aus Restriktionsspaltungen, Größenbestimmungen und "Southern-blot" Analysen gewonnen. Gezeigt ist eine linearisierte Form der physikalischen Karte von SC 167 mit der einzigen Sal I-Schnittstelle als Nullpunkt. Die Orientierung wurde analog zur publizierten Genkarte des Stammes KL14-4A (6) festgelegt.

5. Vergleich der mitochondriellen DNA's der Hefestämme SC 167 und KL14-4A.

Ein Ziel der Restriktionskartierung der mtDNA des Stammes SC 167 war einmal die Kenntnis der physikalischen Struktur dieser DNA und damit die Möglichkeit zur gezielten Klonierung bestimmter mtDNA-Bereiche. Zum anderen sollte aber auch festgestellt werden, ob und inwieweit sich diese mtDNA von bereits bekannten mtDNA's anderer S.cerevisiae Stämme unterscheidet. Als Vergleich wurde der häufig benutzte Stamm KL14-4A herangezogen. Von diesem Stamm ist die genetische Feinstruktur z.B. des mitochondriellen Genlokus OXI 3, dessen Transkripte in dieser Arbeit untersucht werden sollten, genau bekannt. Daher war es wichtig zu wissen, ob diese bekannte OXI 3-Genstruktur als Grundlage für die Charakterisierung von OXI 3-Transkripten in SC 167 herangezogen werden konnte.

Unterschiede sind bereits in den vergleichenden Restriktionsspaltungen beider Stämme mit einigen Enzymen zu erkennen. Wie Fig. 48 zeigt, weisen im Falle einer Eco RI/Hind III/Sal I-Verdauung nur drei von zehn SC 167 mtDNA-Banden bzw. dreizehn KL14-4A mtDNA-Banden die gleiche Größe auf. Bei der Hinc II-Verdauung sind es fünf von jeweils zwölf. In Fig. 49 sind die ringförmigen physikalischen und – soweit bekannt – genetischen Karten der beiden Stämme gegenübergestellt. Die Gesamtlänge des Genoms von SC 167 wurde zu 85 kb bestimmt. Der längste in der Literatur beschriebene Stamm war KL14-4A, der mit 75.8 kb angegeben wird (6). Allerdings wurde die Größe des KL14-4A mt-Genoms in dieser Arbeit zu ca. 86 kb bestimmt. Aufklärung über diese Diskrepanz kann vielleicht die Betrachtung des Eco RI/Hind III-Fragmentes RD 7 geben. Die Größe dieses Fragmentes wurde in dieser Arbeit zu 4040 bp bestimmt. Sanders et.al. (6) geben für dieses Fragment eine Größe von 3600 bp an. Dieses Fragment ist mittlerweile sequenziert und besitzt nach den Sequenzdaten eine Länge von 3999 bp (17). Nimmt man an, daß in

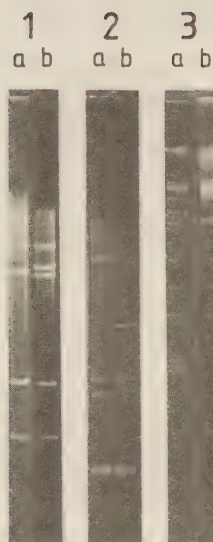


Fig.48 Vergleich dreier Restriktions-Bandenmuster
der *S.cerevisiae* Stämme SC 167 und KL14-4A .

Je 0.5 µg mtDNA der Hefestämme SC 167 (a) und KL14-4A (b) wurden mit den Enzymen bzw. Enzymkombinationen EcoRI (1), EcoRI/Hind III/Sal I (2) und Hinc II (3) erschöpfend verdaut und in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

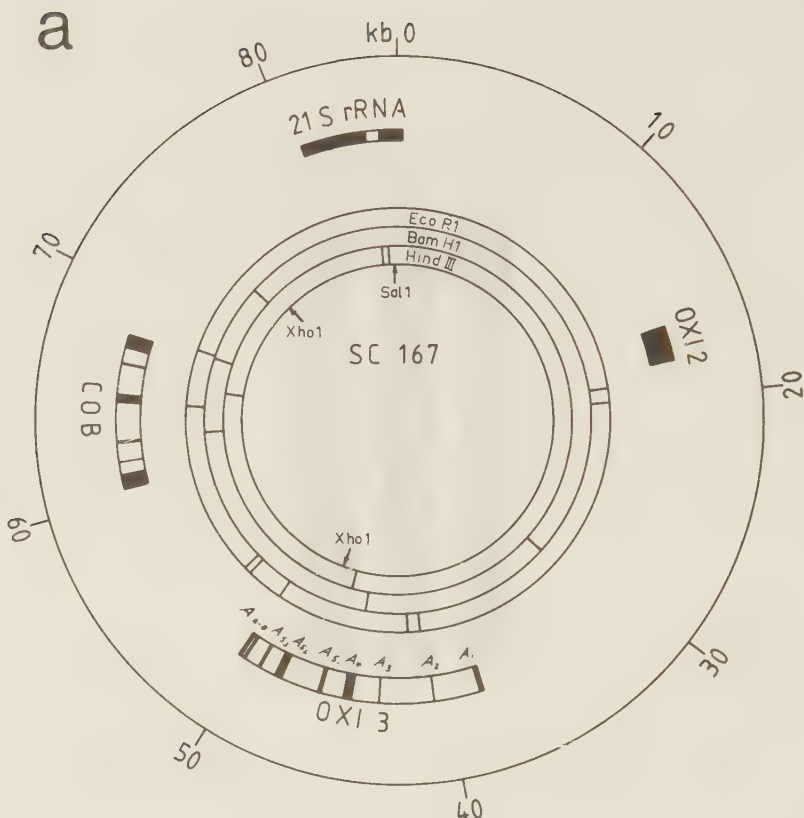


Fig.49 Vergleich der mtDNA-Genkarten von zwei *S.cerevisiae* Stämmen SC 167 (a) und KL14-4A (b).

Gezeigt sind die ringförmigen Genkarten der mtDNA's der Stämme SC 167 (diese Arbeit) und KL14-4A (6) mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI, BamHI, HindIII, XhoI und SalI. Die Genorte der Cytochromoxidase Untereinheiten I, II und III, des Cytochroms b, der ATPase Untereinheiten 6 und 9, des var-Proteins sowie der 21 und 15 S rRNA sind, soweit bekannt, eingetragen. Schwarze Balken kennzeichnen dabei Exons, weiße Balken Introns. Die Exons des OXI 3-Gens sind mit A₁-A₈, die Introns mit I₁-I₇ bezeichnet.

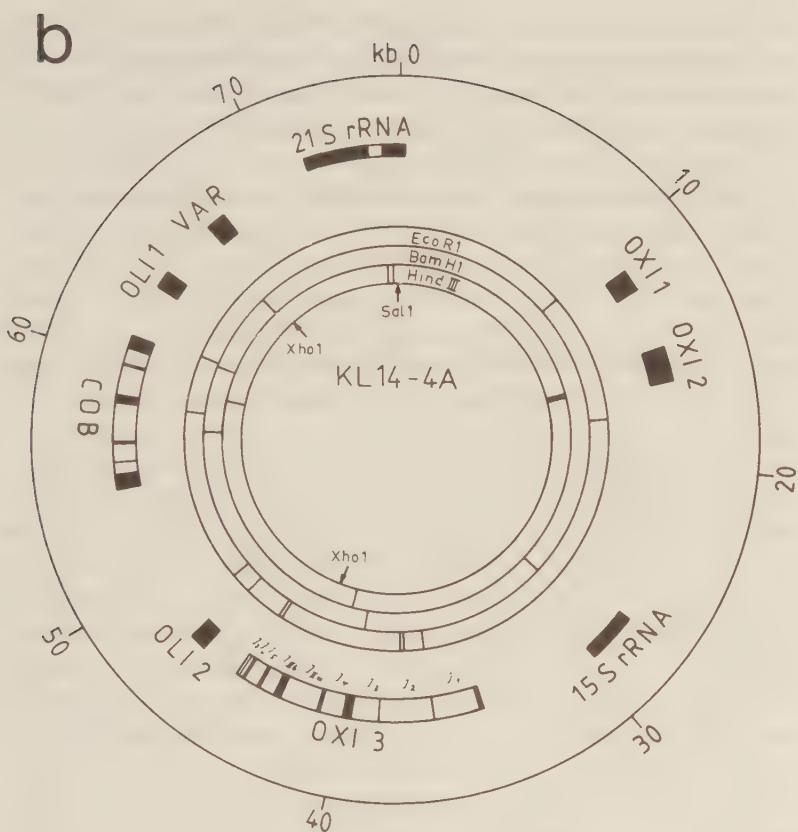


Fig.49 (Fortsetzung)

der Arbeit von Sanders et.al. alle Fragmentlängen um 10 % unterschätzt wurden, so kommt man für die Genomlänge von KL14-4A auf etwa 84 kb. Man wird also schließen dürfen, daß die beiden Stämme annähernd gleich große mtDNA besitzen.

Die Gene COB und OXI 3 konnten durch Hybridisierung in äquivalenten Bereichen der SC167 mtDNA relativ zur KL14-4A mtDNA lokalisiert werden (vgl. Fig.33,36) und sind in Fig.49 eingezeichnet. Auch scheinen die Restriktionsschnittstellen der Enzyme EcoRI, BamHI, HindIII, SalI und XhoI in diesen Bereichen und im Bereich des 21S rRNA-Gens einander zu entsprechen. Ein großer Unterschied zwischen beiden Stämmen zeigt sich in der Region zwischen den Positionen 10 und 20 kb. In diesem Bereich weist KL14-4A ein 9.4 kb EcoRI-Fragment auf, welches die Gene OXI 1 und OXI 2 trägt. Bei SC167 ist in diesem Bereich nur ein 1 kb EcoRI-Fragment zu finden. Auch fehlen in SC167 mtDNA die beiden HindIII-Schnittstellen, die KL14-4A mtDNA hier aufweist. Eine OXI 2 DNA-Probe hybridisiert allerdings mit den angrenzenden Fragmenten in diesem Bereich (vgl. Fig.44). Einen zweiten gravierenden Unterschied zwischen den mtDNA's beider Stämme zeigt Fig.37. Dieses Autoradiogramm wurde durch Hybridisierung von SC167 mtDNA-Verdauungen mit dem EcoRI-Fragment RR 8 von KL14-4A mtDNA erhalten. Als Kontrolle ist eine EcoRI/HindIII-Verdauung von KL14-4A mtDNA mit aufgetragen. Man sieht, daß in SC167 mtDNA keine dem Fragment RR 8 entsprechende Sequenz vorhanden ist. Dies ist insofern verwunderlich, als aus den veröffentlichten Genkarten zu schließen war, daß auf diesem Fragment das Karboxyterminale Ende des OLI 2-Gens liegt (71). Die wahrscheinliche Ursache für diesen Widerspruch ist wohl in Unsicherheiten bei der genetischen Kartierung zu suchen. KL14-4A zeigt in diesem Bereich zwei EcoRI-Banden mit 2.5 und 1.8 kb Länge, während bei SC167 hier zwei EcoRI-Banden mit 2.5 und 0.5 kb zu finden sind. Die einzige PstI-Schnittstelle, die KL14-4A mtDNA besitzt, liegt in dem 1.8 kb Fragment RR 8 (6), und ist in SC167 nicht vorhanden.

Es kann also festgehalten werden, daß die beiden Stämme SC 167 und KL14-4A zwei sehr ähnliche mtDNA's besitzen, die allerdings im Bereich der Gene OXI 1 und OLI 2 zwei markante Unterschiede aufweisen. Bezüglich der für diese Arbeit besonders interessanten Gene Oxi 3 und COB konnte anhand dieser – wenn auch noch recht groben – Kartierung keine Abweichung festgestellt werden.

6. Klonierung von mtDNA Restriktionsfragmenten der Stämme KL14-4A und SC 167.

Für die in dieser Arbeit geplante Untersuchung von Transkriptionsprodukten der OXI 3-Region sollten definierte Abschnitte derselben als Hybridisierungsproben eingesetzt werden. Nachdem in bestimmten nuklearen pet-Mutanten das OXI 3-Genprodukt entweder spezifisch oder zusammen mit anderen mitochondrialen Translationsprodukten fehlte (60), sollte hier untersucht werden, in welchen Fällen dieser Ausfall durch einen Defekt im Reifungsprozess der OXI 3-mRNA hervorgerufen wurde. Da die zu untersuchenden pet-ts Mutanten Abkömmlinge des Stammes SC 167 waren, und da gewisse Stamm-spezifische Unterschiede der Struktur des Mosaik-Gens OXI 3 bekannt sind (18), erschien es zunächst ratsam, für die "Northern blot"-Hybridisierung von RNA aus SC 167-Mitochondrien homologe, d.h. aus SC 167 gewonnene, mtDNA-Proben einzusetzen.

In der Praxis wurde in der vorliegenden Arbeit dann versucht, aus beiden Stämmen möglichst viele geeignete mtDNA-Fragmente zu isolieren. Diese Isolierung kann grundsätzlich auf drei verschiedenen Wegen erfolgen:

- (i) Es ist möglich, restriktionsgespaltene DNA präparativ auf einem Agarose-Gel zu trennen und die DNA einzelner Banden daraus zu isolieren.

- (ii) Man kann Restriktionsfragmente mittels geeigneter Plasmid-Vektoren in E.coli klonieren und daraus die Plasmid-DNA in hoher Ausbeute rein gewinnen .
- (iii) Schließlich kann praktisch jeder Bereich der mtDNA aus geeigneten rho⁻-Mutanten in reiner Form gewonnen werden . Anders als bei den Methoden (i) und (ii) sind hier Herkunft und Länge des isolierten mtDNA-Abschnittes weitgehend dem Zufall überlassen .

Die erste Methode hat drei Nachteile ; zum einen werden die gewünschten Fragmente nur in geringen Mengen isoliert ; zum anderen sind wegen des Vorhandenseins des Hintergrundes im Gel von statistisch geschnittenen mtDNA-Stücken unterschiedlicher Herkunft und Größe die definierten Restriktionsfragmente nicht völlig rein zu isolieren . Schließlich lassen sich die aus dem Gel isolierten Restriktionsfragmente wegen möglicherweise in ihnen vorhandener längerer Einzelstrangbereiche oft nur mit geringer spezifischer Aktivität "nick-translatieren". Diese Nachteile fallen weg , sobald mtDNA-Fragmente kloniert vorliegen . In dieser Form sind sie leicht rein und in ausreichender Ausbeute zugänglich . rho⁻-Mutanten schließlich können in tandemartiger Vervielfältigung die verschiedensten mtDNA-Teilbereiche enthalten (72). Insofern können sie als ein natürliches Klonierungssystem für mtDNA angesehen werden . Auf der anderen Seite aber ist die in rho⁻-Mutanten enthaltene DNA nie ganz stabil , sondern neigt dazu , ihre repetitive Grundeinheit nach und nach zu verkürzen (73). Weiterhin können Genumstrukturierungen gegenüber der mtDNA des Wildtyps auftreten (74). Schließlich muß zur Charakterisierung von rho⁻-Mutanten DNA jeweils eine Deletionskartierung mit geeigneten mit⁻-Mutanten durchgeführt werden .

Aus diesen Gründen wurde in erster Linie versucht , mtDNA-Restriktionsfragmente mit Hilfe von Plasmid-Vektoren in E.coli K12 zu klonieren . In Fig.50 sind die hierbei als Vektoren benutzten Plasmide abgebildet . Routinemäßig wurde zunächst das Plasmid pBR 325 benutzt . Nachdem jedoch bekannt geworden war ,

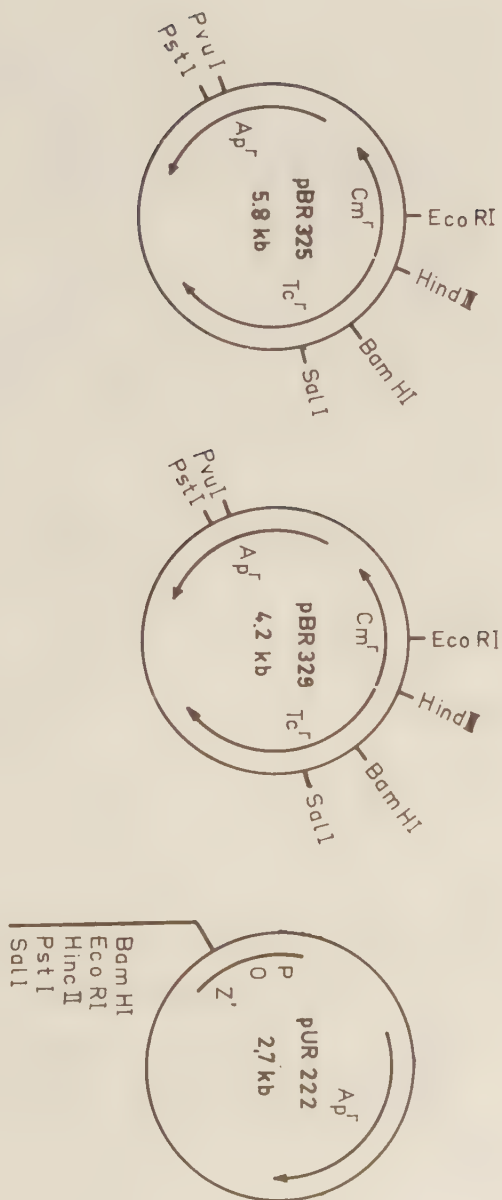


Fig. 50 Genkarten der Plasmid-Vektoren pBR 325 (a), pBR 329 (b) und pUR 222 (c).

Gezeigt sind die ringförmigen Genkarten der Plasmide pBR 325 (31), pBR 329 (32) und pUR 222 (33) mit den Positionen der in den jeweiligen Plasmiden vorhandenen Resistenzgenen und den wichtigsten zu Klonierungen verwendbaren Restriktionsschnittstellen.

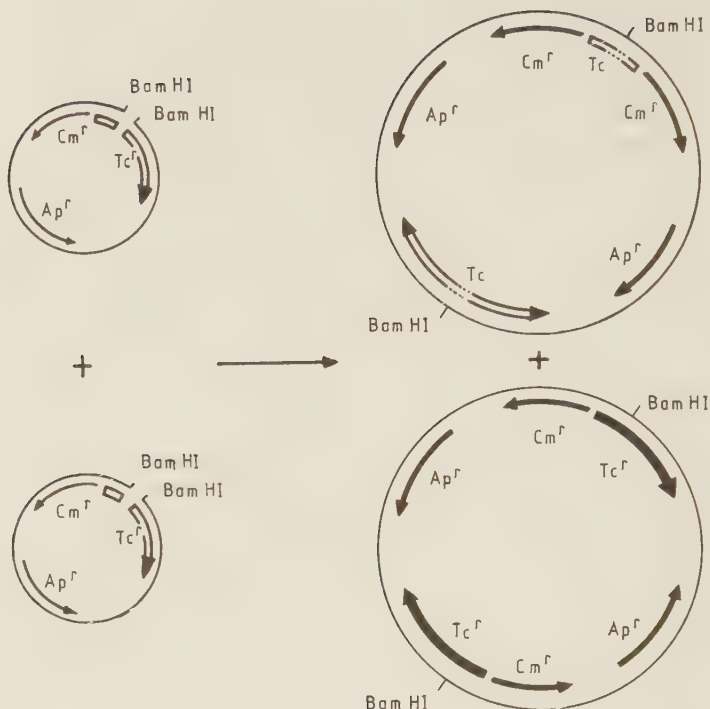


Fig.51 Selbstligation von Plasmid-Vektoren.

Plasmide die nur an einer Restriktionsschnittstelle innerhalb eines Antibiotikum-Resistenzgens geöffnet sind können in zwei entgegengesetzten Orientierungen selbstligiert werden, wobei in 50 % der Fälle die Antibiotikum-Resistenz restauriert wird.

daß dieses Plasmid eine zweite Kopie des C-terminalen Teils des Tc^r -Gens invers verdoppelt auch noch am Ende des Cm^r -Gens enthält (32), und das dies zur Instabilität von klonierten DNA-Fragmenten führen könnte, wurden zusätzlich auch noch Versuche mit den Plasmiden pBR 329 und pUR 222 durchgeführt. In Tab.12 sind die Ergebnisse von 8 Klonierungsexperimenten dargestellt. Darin sind für jedes Experiment Art und Vorbehandlung der zu klonierenden DNA und des benutzten Vektors sowie der verwendete *E.coli*-Stamm aufgeführt. Die Versuchsergebnisse geben an, wieviele *E.coli*-Transformanten in jedem Experiment insgesamt erhalten wurden, wieviele von ihnen im β -Galaktosidase-Gen oder in einem Antibiotikaresistenz-Gen des Vektors eine DNA-Insertion trugen und in wievielen diese Insertion nachweislich ein Stück mtDNA war. In allen Experimenten war der Anteil an Transformanten welche ein Hybridplasmid aus Vektor und inserierter mtDNA enthielten, relativ gering (10-30%). Auch durch Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNA vor der Ligation konnte dieser Anteil nur unwesentlich gesteigert werden. Keiner der drei verschiedenen benutzten Vektoren erwies sich im Vergleich zu den anderen hinsichtlich der Ausbeute an Hybridplasmiden als überlegen.

In allen Experimenten war die Mehrzahl der Transformanten frei von eingebauter mtDNA. Wenn trotzdem die Zellen phänotypisch Tc^r, Cm^s waren, so kann dies – zumindest in 50% der Fälle – mit einer Selbstligation der aufgeschnittenen Plasmid-DNA erklärt werden (vgl. Fig. 51). Eine Behandlung des restriktionsgeschnittenen Vektors mit alkalischer Phosphatase um die 5'-Phosphatgruppen zu entfernen, und so die Selbstligation des Vektors zu unterbinden, führte bei den Vektoren pBR 325 und pBR 329 zu einer Verbesserung des Verhältnisses Tc^r zu Cm^s bzw. Ap^r zu Tc^s -Kolonien von 10:1 auf 1:1. Der Nachweis des Einbaus von mtDNA in das Vektor-Plasmid erfolgte entweder durch Gelelektrophorese von restriktionsgespaltenen Plasmid-DNA ("Miniscreens", Fig. 52) oder durch Koloniehybridisierung der Transformanten-Zellen mit ^{32}P -markierter mtDNA (Fig. 53). Bei der Untersuchung einer größeren Zahl von Transformanten

Tab.12 Ergebnisse von Klonierungsexperimenten. Die Methoden zur mtDNA(Fragment)- und Plasmid-Isolierung, der Restriktionsspaltung und Ligierung von mtDNA-Probe mit Plasmid-Vektor, der Phosphatase-Behandlung (phos.) des Vektors, sowie der E.coli Transformation sind in Material und Methoden angegeben.

mtDNA-Probe	Vektor	E. coli Stamm	Tc ^r	Cm ^s	Ap ^r	Tc ^s	klon. Frag.
KL14-4A (Eco R1)	pBR 325 (Eco R1)	RR 1	1241	-	-	-	-
	pBR 325 (Eco R1)	SK 2881	637	76	-	-	11
KL14-4A (Eco R1)	pBR 325 (Eco R1)	RR 1	578	88	-	-	7
KL14-4A (Eco R1)	pBR 325 (Eco R1)	RR 1	603	75	-	-	23
KL14-4A (Eco R1/Hind III)	pBR 325 (Eco R1/phos.)	RR 1	8	0	-	-	-
	pBR 325 (Eco R1/HindIII/ phos.)	RR 1	-	-	278	256	78
SC 167 (Eco R1)	pBR 325 (Eco R1/phos.)	RR 1	110	109	-	-	11
	pBR 329 (Eco R1/HindIII/ phos.)	RR 1	0	-	-	-	-
KL14-4A DR 6, RD 7	pBR 329 (Eco R1/HindIII/ phos.)	RR 1	-	-	20	20	20
SC 167 (Eco R1/Bam HI)	pBR 329 (Eco R1/Bam HI/ phos.)	RR 1	-	-	219	197	63
KL14-4A (Eco R1/Hind III)	pUR 222	JM 103			301	0	
	pUR 222 (Eco R1/Hind III)	JM 103			213	10	10

klon.Frag.=Anzahl rekombinanter Plasmide mit eingebauter mtDNA

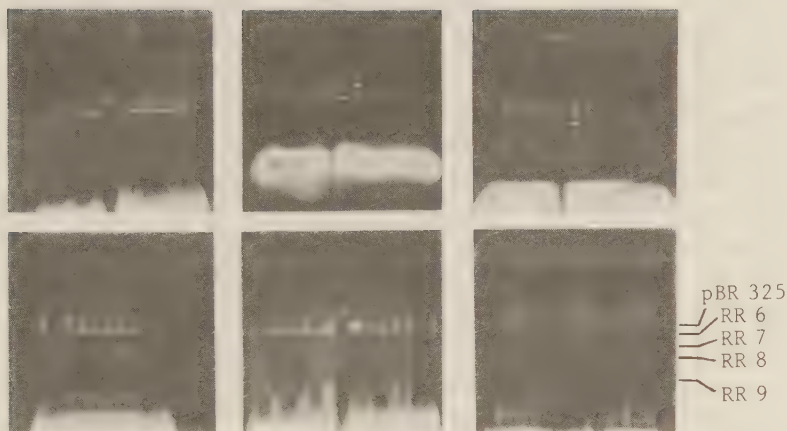


Fig.52 "Miniscreens" zur Analyse der Plasmid-DNA's rekombinanter E.coli-Klone.

Die Klonierung von KL14-4A mtDNA EcoRI-Fragmenten, die Isolierung der Plasmid-DNA und ihre gelelektrophoretische Charakterisierung wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

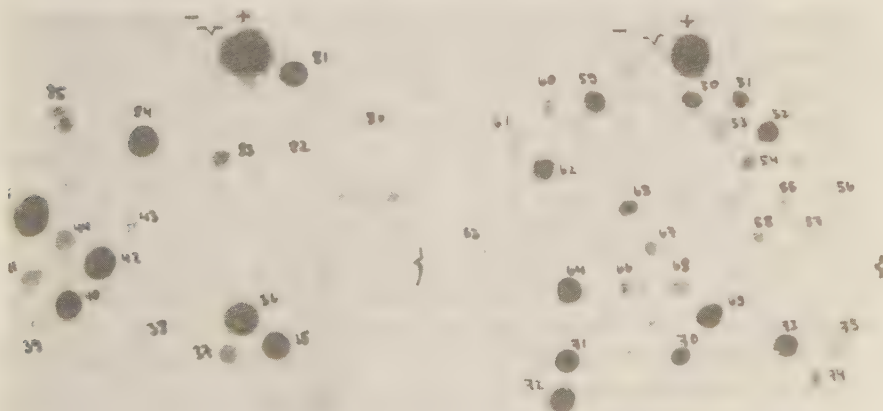


Fig.53 Koloniehybridisierungen von E.coli-Klonen aus einem Trans-
formationsexperiment.

Mit einem Ligationsgemisch aus pBR 325 und KL14-4A EcoRI-Fragmenten transformierte E.coli durch ³²P-Koloniehybridisierung nach Grunstein und Hogness (87) mit Hilfe ³²P-markierter KL14-4A mtDNA auf Kolonien mit rekombinanten Plasmiden untersucht. - = negative Kontrolle (pBR 325 in RR 1); + = positive Kontrolle (mtDNA).

wurden zunächst durch Koloniehybridisierung (87) die mtDNA-haltigen Klone ermittelt und dann die in ihnen enthaltene Hybridplasmid-DNA nach Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch charakterisiert. In Fig.54 sind Gelbilder und zugehörige "Southern-blot" Hybridisierungen von klonierten DNA-Fragmenten zu sehen. Anhand der zuvor bestimmten Restriktionskarten von KL14-4A und SC167 konnten die in verschiedenen Experimenten klonierten mtDNA-Restriktionsfragmente eindeutig identifiziert werden (vgl. Fig.55). Die so klonierten DNA-Abschnitte sind in den Genkarten von Fig.56 dargestellt.

Es fällt auf, daß in beiden Fällen nur relativ kleine und in homologen Regionen der beiden Mitochondriengenome lokalisierte Restriktionsfragmente kloniert werden konnten (1-4 kb). Demgegenüber entzogen sich große Bereiche des mtGenoms der Klonierung, möglicherweise weil hier mit den von uns verwandten Enzymen nur relativ große (4-20 kb) Fragmente anfallen. Andererseits konnten diese Bereiche der mtDNA auch dann nicht kloniert werden, wenn durch eine Doppelverdauung Restriktionsfragmente geeigneter Größe aus ihnen vorlagen. So treten bei einer EcoRI/HindIII-Spaltung der KL14-4A mtDNA zwei Fragmente DR 6 und RD 7 mit einer Länge von 4.0 bzw. 3.6 kb (gemäß (6)) im Bereich des OXI 3-Gens auf. Bei einer Restriktionsverdauung von mtDNA liegen diese annähernd gleich großen Fragmente im Verhältnis 1:1 vor. Trotzdem wurden bei einer Untersuchung von 57 Transformanten, die aus einer EcoRI/HindIII-Spaltung von KL14-4A mtDNA hervorgegangen waren, zwar 20 Plasmide gefunden, die das Fragment RD 7 eingebaut hatten, jedoch keines mit eingebautem Fragment DR 6 (vgl. Fig.57). Möglicherweise verhindert die bekannte und durch eine Vielzahl von direkten Repetitionen und Sequenzhomologien (GC-Cluster und AT-Spacer) bedingte, ungewöhnlich hohe Rekombinationsrate der mtDNA einen stabilen Einbau größerer mtDNA-Fragmente in die Plasmid-DNA. In jüngster Zeit wurde bekannt, daß auch das Vorhandensein von direkten Sequenzrepetitionen in DNA-Fragmenten anderer Herkunft deren stabiles Klonieren verhindert (75).

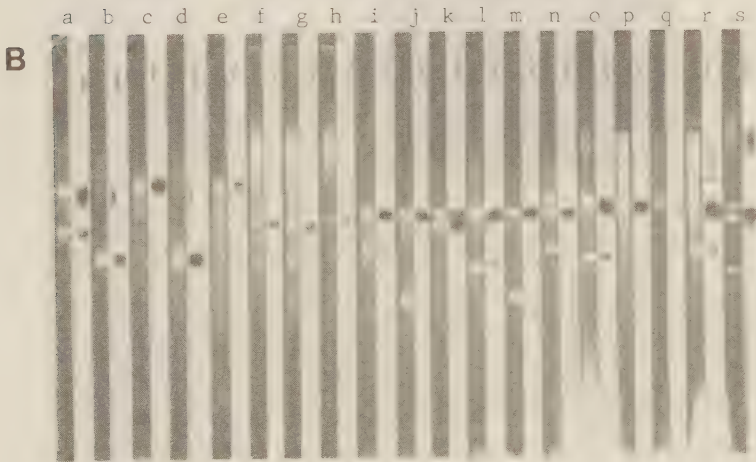
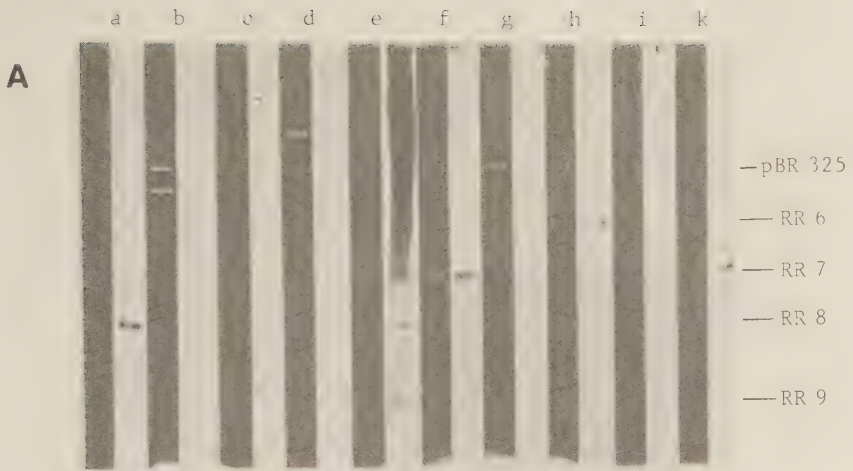


Fig.54 "Southern"-Hybridisierung von klonierten mtDNA-Fragmenten.

Agarosegel-Elektrophorese und "Southern-blot" Hybridisierung von klonierten KL14-4A mtDNA- (A) und SC 167 mtDNA-Fragmenten (B). KL14-4A mtDNA (Ae) und Plasmid-DNA's (Aa-d,f-k) aus einem Klonierungsexperiment mit KL14-4A mtDNA EcoRI-Fragmenten wurden in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert, geblottet und mit ^{32}P -markierter mtDNA hybridisiert. SC 167 mtDNA EcoRI-verdaut (Bi), EcoRI/BamHI-verdaut (Bg), KL14-4A mtDNA EcoRI-verdaut (Bh) und Plasmid-DNA's aus Klonierungsexperimenten mit SC 167 mtDNA EcoRI-Fragmenten (Ba-e), BamHI/EcoRI-Fragmenten (Bi-n) und Hind III-Fragmenten wurden in einem 0.5 % Agarosegel elektrophoretisiert, geblottet und mit ^{32}P -markierter Plasmid-DNA (pBR 325) die das SC 167 EcoRI/BamHI-Fragment RB 6 hybridisiert. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

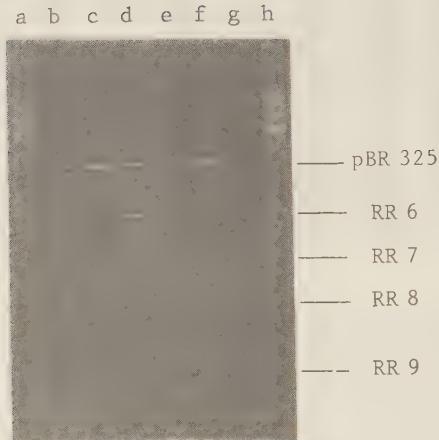


Fig.55 Klonierte KL14-4A mtDNA EcoR1-Fragmente .

KL14-4A mtDNA EcoR1-Fragmente wurden mit Hilfe des Plasmid-Vektors pBR 325 in *E.coli* RR 1 kloniert. Iso- lierte Plasmid-DNA wurde mit EcoR1 gespalten und zu- sammen mit EcoR1-gespaltenen KL14-4A mtDNA in einem 0.6 % Agarosegel elektrophoretisiert. Bzgl. Einzelhei- ten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Metho- den.

KL14-4A mtDNA (EcoR1) (a,h), pBR 325-RR 6 (b,d), pBR 325- RR 7 (c,e), pBR 325-RR 8 (f), pBR 325-RR 9 (g).

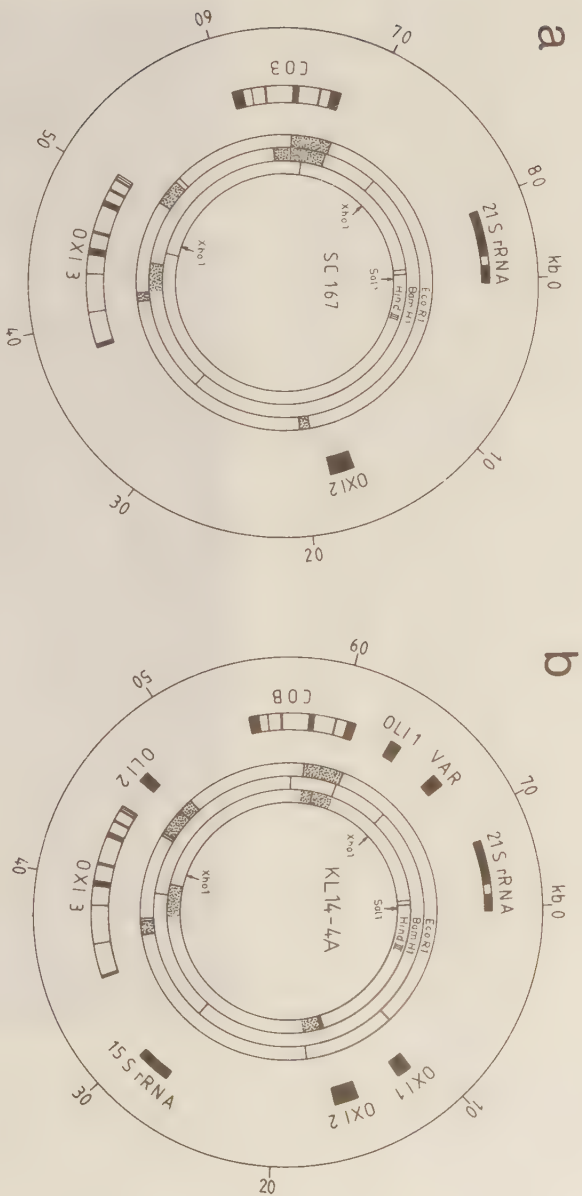


Fig. 56 Klonierte mtDNA-Restriktionsfragmente aus den Hefestämmen SC 167 (a) und KL14-4A (b).
 mtDNA-Restriktionsfragmente der *S.cerevisiae* Stämme SC 167 und KL14-4A wurden mit den Plas-
 mid-Vektoren pBR 325 bzw. pBR 329 ligiert und in den *E.coli* Stämmen RR 1 bzw. SK 2881 kloniert
 wie in Material und Methoden beschrieben. Erhalten wurden aus SC 167 die Fragmente RR 5, RR 6,
 RR 7, RR 8, RB 6, RB 7 und RB 8 (a); aus KL14-4A die Fragmente RR 6, RR 7, RR 8, RR 9, DR 10
 und RD 12 (b). Diese sind in der Fig. in den ringförmigen Genkarten der beiden Hefestämme ge-
 punktet dargestellt.

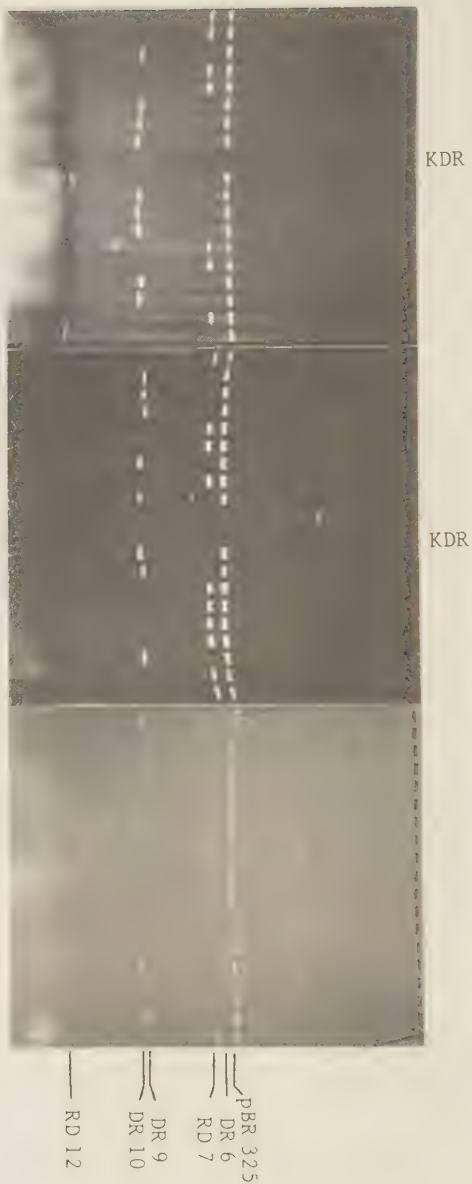


Fig. 57 Gelelektrophoretische Charakterisierung rekombinanter Plasmide einer Klonierung von KL14-4A mtDNA Eco RI/Hind III-Fragmenten.

KL14-4A Eco RI/Hind III gespaltene mtDNA wurde mit gleichartig verdaulichem Plasmid-Vektor pBR 325 ligiert, in *E. coli* RR1 kloniert und dabei erhaltene Ap^r Ic^s Kolonien gesammelt. Aus diesen wurde Plasmid-DNA isoliert, mit Eco RI und Hind III restriktionsgespalten und in einem 0,6 % Agarosegel elektrophoretisiert. Die benutzten Techniken sind in Material und Methoden beschrieben. Die Fragmentbezeichnungen sind angegeben. KRD = Eco RI Hind III-gespaltene KL14-4A mtDNA.

C. Analyse von Transkriptionsprodukten in pet-ts Mutanten.

Die Untersuchung von mitochondriellen Translationsprodukten in pet-ts Mutanten nach Kultivation bei nicht-permissiver Temperatur durch Michaelis et.al.(60) hatte gezeigt, daß Kernmutationen ursächlich sein können für den Verlust der Fähigkeit, spezifisch einzelne oder mehrere mitochondriell kodierte Proteine in den Mitochondrien zu synthetisieren. In diesen Versuchen war die mitochondrielle Proteinsynthese bei nicht-permissiver Temperatur mittels Pulsmarkierung und anschließender LiDS-Gelelektrophorese der markierten Produkte in 228 pet-ts Mutanten (184 verschiedene Komplementationsgruppen) untersucht worden. Dabei hatten Vertreter von 107 verschiedenen Komplementationsgruppen dasselbe Proteinmuster wie der Wildtyp gezeigt. In den restlichen Komplementationsgruppen fehlten entweder alle mitochondriellen Translationsprodukte (24 Gruppen) oder es trat ein Einzel- oder Doppeldefekt für einige von ihnen auf (47 Gruppen). Die genaue Aufschlüsselung der Defekte und einige Beispiele sind in Fig.58 gezeigt. Unter den spezifischen Defekten war besonders häufig ein Ausfall der Cytochromoxidase Untereinheit I zu beobachten. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich auf zwei Arten deuten. Zum einen könnte in den betreffenden Mutanten der mitochondrielle Proteinsyntheseapparat geschädigt sein. Solche Defekte sollten eher zum Ausfall aller, als zum Fehlen eines einzelnen der in Fig.58 sichtbaren mitochondriellen Translationsprodukte führen. Weiterhin könnte aber auch die mitochondrielle RNA-Synthese, entweder ganz allgemein oder auch hinsichtlich der posttranskriptionalen Reifung eines bestimmten Transkriptionsproduktes spezifisch geschädigt sein. Derartige Schäden können alle beobachteten Änderungen der mitochondriellen

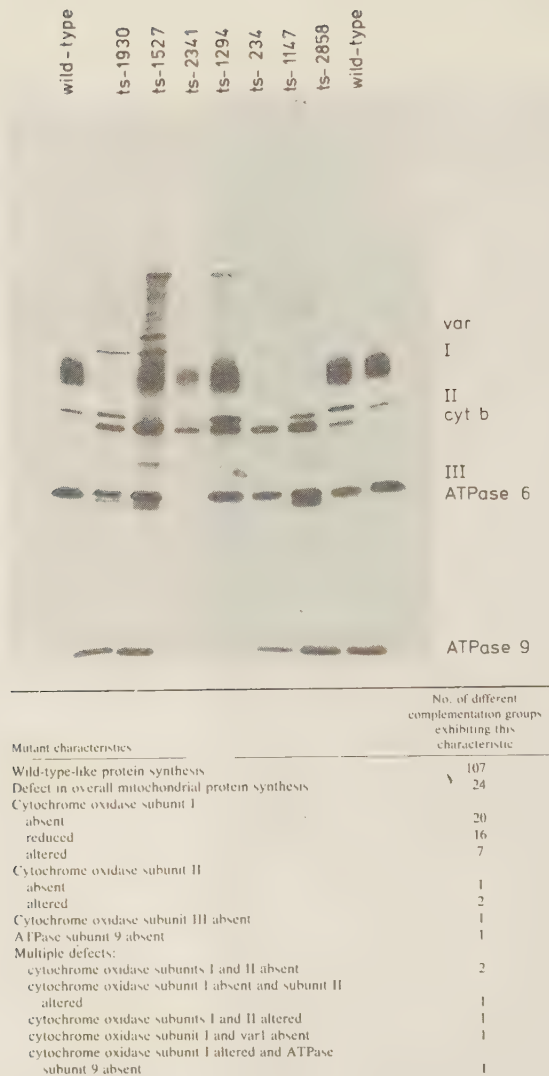


Fig.58 Mitochondrielle Translationsprodukte in nuklearen pet-ts Mutanten.

(A) LiDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von ^{35}S -markierten mitochondrialen Translationsprodukten in ausgewählten *pet-ts* Mutanten. var = VarI Protein; I, II und III = Untereinheiten der Cytochromoxidase; cyt b = Cytochrom b; ATPase 6 und 9 = Untereinheiten der mitochondrialen ATPase. Entnommen aus (60).

(B) Tabellarische Darstellung der Defekt-Charakteristiken mitochondrialer Translationsprodukte in *pet-ts* Mutanten aus 184 verschiedenen Komplementationsgruppen. Entnommen aus (60).

Proteinsynthese in den untersuchten Mutanten erklären. Um festzustellen, welche der genannten Fehlermöglichkeiten in den einzelnen pet-ts Mutanten vorlag, sollten in dieser Arbeit die mitochondriellen Transkriptionsprodukte in den betreffenden Mutanten charakterisiert werden. Dabei sollten zum einen die RNA-Synthese ganz allgemein und zum anderen die Reifung speziell der OXI 3-Transkripte untersucht werden.

1. Vorversuche zur Isolierung und gelelektrophoretischen Charakterisierung von mtRNA.

In der Literatur sind mehrere Methoden zur Isolierung von mtRNA und ihrer gelelektrophoretischen Charakterisierung beschrieben. Es erschien daher angebracht, einige dieser Methoden im Hinblick auf ihre Eignung für die geplante pet-ts Mutanten Charakterisierung zu überprüfen.

Die folgenden RNA-Isolierungsmethoden wurden untersucht:

- a) Isolierung von Gesamt-RNA aus intakten Hefezellen
- b) Isolierung von mtRNA aus gereinigten Mitochondrien
- c) Isolierung von mtRNA aus gereinigten Mitochondrien welche zuvor mit Mikrokokkus-Nuklease behandelt worden waren
- d) Isolierung von mtRNA aus gereinigten Mitochondrien in Ggw. von Nuklease-Inhibitoren (Vanadyl-Nukleoside).

Zur gelelektrophoretischen Charakterisierung der isolierten RNA-Präparationen wurden die folgenden Systeme herangezogen:

- a) nicht-denaturierende Agarose-Gele
- b) nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gradientengele
- c) Harnstoff-haltige Agarose-Gele
- d) Formaldehyd-haltige Agarose-Gele.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefezellen ist der schnellste Weg, um analysierbare RNA-Proben zu erhalten. Es muß jedoch sichergestellt sein, daß die begleitende und in großem Überschuß vorhandene Kern-kodierte RNA mit dem Nachweis spezifischer mtRNA-Arten nicht interferiert, sei es durch



Fig.59 Vergleich von "Northern-blot" Hybridisierungen der Gesamt-RNA und mtRNA des Wildtyps SC167 .

Gesamt RNA (a) und mtRNA (b) aus SC 167 wurde in einem 1.2 % Formaldehyd/Agarose-Gel elektrophoretisiert, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit ^{32}P -markierter OXI 3 mtDNA-Probe hybridisiert (vgl. Material und Methoden). Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe wurden Mitte der log-Phase geerntete Hefezellen in fl. N_2 eingefroren und unter Kühlen mit fl. N_2 im Braun Mikrodismembrator 4 x 40 sec durch Schütteln aufgeschlossen. Unmittelbar nach Abdampfen des N_2 wurden 3 ml/g Zellen 50 mM Tris-Cl pH 7.5/20 mM EDTA/5 mM Mercaptoethanol/2 % SDS/1 mg/ml Heparin/1 mM UMP (Wasser zum Ansetzen der Pufferlösungen mit Diethylpyrocarbonat 1:1000 autoklavieren) zugesetzt. Noch vor Auftauen des Gemisches wurde 1 Vol. Phenol (gesättigt mit 10 mM Tris-Cl pH 7.5/1 mM EDTA) zugegeben und 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (8000 x g, 5 min, 20 °C) wurde die wässrige Phase noch 2 x mit Phenol und 3 x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zum letzten Überstand wurde 0.1 Vol. 3 M Na-ac pH 5.3 gegeben und mit 2.5 Vol. kaltem Ethanol (-20 °C) gefällt (12 hr). Die gefällte, abzentrifugierte (10000 x g, 20 min, 4 °C) und getrocknete RNA wurde in 10 mM Tris-Cl pH 7.5/0.5 % SDS zu 1 mg/ml aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

unspezifische Kreuzhybridisierung oder durch eine mit den Grenzen der Beladbarkeit des Gels zusammenhängende Senkung der Empfindlichkeit. In Fig.59 ist das Autoradiogramm einer Hybridisierung von gelelektrophoretisch aufgetrennter SC167 mtRNA und SC167 Gesamt-RNA mit einer OXI 3-Probe (Intron 2, EcoRI-Fragment RR10, vgl. Probe c in Fig. 63) zu sehen. Mit Gesamt-RNA sind hierbei nur zwei relativ schwache Banden – vermutlich die beiden herausgeschnittenen und zu 50 % homologen Introns αI_1 und αI_2 – erkennbar, während bei Verwendung von mtRNA außer einer starken Schwärzung an der Position der beiden Introns 1 und 2 auch noch 5 andere, schwächere und offensichtlich noch die Introns 1 und/oder 2 enthaltende Vorstufen sichtbar werden. Wollte man eine ähnliche Bandenintensität auch mit Gesamt-RNA erreichen, so müßte man mehr als die zehnfache Menge RNA auf das Gel auftragen. Das ist praktisch nicht möglich. Unter Umständen könnte jedoch die Verwendung einer sehr hoch radioaktiv markierten DNA-Probe auch mit Gesamt-RNA zu demselben Ergebnis wie die hier verwendete mtRNA führen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde jedoch auf Grund der aus Fig.59 ersichtlichen höheren Empfindlichkeit stets die aus Mitochondrien angereicherte mtRNA eingesetzt.

Die aus gereinigten Mitochondrien isolierten RNA-Präparationen (mtRNA) sind wahrscheinlich noch zu einem gewissen Grad mit cytoplasmatischer RNA verunreinigt. Als Maß für diese Verunreinigung kann die Intensität der beiden großen rRNA Banden herangezogen werden (vgl. Fig.60). Eine Möglichkeit solche Verunreinigungen zu verringern könnte in einer Behandlung der isolierten Mitochondrien mit Mikrokokkus-Nuklease bestehen. Dabei sollte die den Mitochondrien anhaftende cytoplasmatische RNA weitgehend abgebaut werden, während die mtRNA in der Organelle vor dem Nuklease-Angriff geschützt bleibt. Aus einem Vergleich der in Fig.60 (a) und (b) gezeigten RNA-Muster geht hervor, daß eine derartige Nuklease-Vorbehandlung die relative Intensität eines der beiden rRNA-Bandenpaare spezifisch schwächt. Dieses Ergebnis spricht einmal dafür, daß es sich bei den schwächer gewordenen Banden um cytoplasmatische

rRNA handelte, obwohl sie in dem hier verwendeten Gelsystem schneller als die (kleineren) mitochondriellen rRNA-Komponenten wanderten. Der letztgenannte Effekt ist bekannt und wurde auch von anderen Autoren beobachtet (76). In weiter unten beschriebenen Versuchen wurde durch vergleichende Elektrophorese von mtRNA mit gereinigter cytoplasmatischer rRNA ebenfalls gezeigt, daß es sich bei der hier durch Nuklease abgebauten RNA um cytoplasmatische rRNA handelt. In späteren Versuchsreihen wurde dennoch auf eine routinemäßige Verwendung dieser Nuklease-Behandlung verzichtet, da die Gefahr eines unerwünschten Abbaus von bestimmten, nur in geringer Menge vorliegenden mitochondriellen RNA-Spezies nicht ganz auszuschließen war.

Die Darstellung von Hefemitochondrien und die Isolierung von mtRNA aus ihnen erstreckt sich über einen Zeitraum von 3-4 hr. Dabei besteht einmal die Gefahr, daß die thermosensitive Proteinkomponente in den Mitochondrien unter den permissiven Temperaturbedingungen der Mitochondrienisolierung reaktiviert und damit und damit die isolierte mtRNA den Mutanten-Phänotyp nicht mehr wiedergibt. Es wurden in dieser Arbeit keine Experimente durchgeführt, die diesen Einwand entkräften könnten. Aus Erfahrungen, die an diesem Institut jedoch mit ts-Mutanten der Fettsäure-Synthetase und AcetylCoA-Karboxylase gemacht wurden, wird es allerdings für unwahrscheinlich gehalten, daß eine derartige Reaktivierung stattfindet. Weiterhin besteht die Gefahr, daß mtRNA während der Aufarbeitung durch endogene Nukleasen angegriffen und dadurch das schließlich untersuchte RNA-Muster verfälscht wird. Um dem vorzubeugen, wurde mtRNA auch in Ggw. von Vanadylnukleosiden als RNase-Inhibitoren isoliert. Derartig gewonnene mtRNA ist ebenfalls in Fig. 60 abgebildet. Ein Vergleich der Bahnen (a) und (c) in Fig. 60 zeigt, daß durch die Inhibitoren neben kaum feststellbaren Unterschieden im diffusen mRNA/prä-mRNA-Hintergrund der Gele vor allem das Verhältnis von cytoplasmatischer zu mitochondrieller rRNA zueinander zugunsten der cytoplasmatischen Komponenten verschoben wird. Da dies kein er-

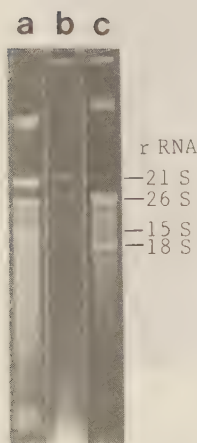


Fig.60 Vergleich der Agarosegel-Elektrophorese Banden-
muster von ,nach verschiedenen Methoden isolier-
ten ,mtRNA's .

mtRNA aus SC 167 wurde aus gereinigten Mitochondrien (a), Micrococcus Nuklease behandelten Mitochondrien (b) und aus gereinigten Mitochondrien in Ggw. von Vanadyl-nukleosiden als RNase-Inhibitoren (c) isoliert und in einem Harnstoff/Agarose-Gel elektrophoretisiert. Nach Anfärben mit EtBr wurden die Gele unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert. Micrococcus Nuklease wurde zu den Mitochondrien in 10 mM Tris-Cl pH 8.0/10 mM $MgCl_2$ /0.9 M Sorbit in einem Vol. von 0.3 ml/g Zellen das nach 1 min. stehen bei RT 3 mM an $CaCl_2$ gemacht worden war mit 10 U/ml zugesetzt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde EGTA zu 6 mM zugesetzt und die mtRNA wie gewöhnlich extrahiert. Vanadyl-nukleoside wurden nach (89) dargestellt und während der gesamten mtRNA Isolierung zu 10 mM zugesetzt.

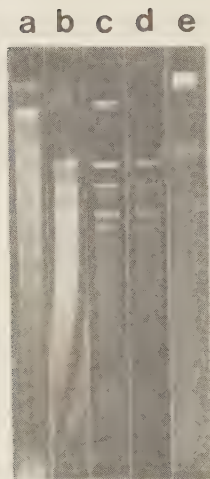


Fig.61 Vergleich der mtRNA Bandenmuster in vier verschiedenen Gelelektrophorese-Systemen .

SC 167 mtRNA wurde in Polyacrylamid-Gradientengelen (a), Agarosegelen (b), Harnstoff/Agarose-Gelen (c,d) und Formaldehyd/Agarose-Gelen (e) elektrophoretisiert und nach Anfärben mit EtBr photographiert. Polyacrylamid-Gradientengele (3-12 % Acrylamid, linear) wurden mit einem Puffersystem 50 mM Tris-ac pH 7.4/25 mM Na-ac/1 mM EDTA eingesetzt. Nicht denaturierende Agarosegele wurden mit 90 mM Tris-borat pH 8.3/2.5 mM EDTA verwendet. Harnstoff/Agarose- und Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophoresen wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Proben für die Elektrophoresen wurden zum einen mit Harnstoff (a,c), zum anderen mit Formaldehyd (d,e) bzw. gar nicht (b) denaturiert (s. Material und Methoden).

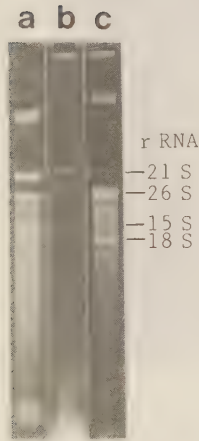


Fig.60 Vergleich der Agarosegel-Elektrophorese Banden-
muster von , nach verschiedenen Methoden isolier-
ten , mtRNA's .

mtRNA aus SC167 wurde aus gereinigten Mitochondrien (a), Micrococcus Nuklease behandelten Mitochondrien (b) und aus gereinigten Mitochondrien in Ggw. von Vanadyl-nukleosiden als RNase-Inhibitoren (c) isoliert und in einem Harnstoff/Agarose-Gel elektrophoretisiert. Nach Anfärben mit EtBr wurden die Gele unter Beleuchtung mit langwelligem UV-Licht photographiert. Micrococcus Nuklease wurde zu den Mitochondrien in 10 mM Tris-Cl pH 8.0/10 mM $MgCl_2$ /0.9 M Sorbit in einem Vol. von 0.3 ml/g Zellen das nach 1 min. stehen bei RT 3 mM an $CaCl_2$ gemacht worden war mit 10 U/ml zugesetzt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde EGTA zu 6 mM zugesetzt und die mtRNA wie gewöhnlich extrahiert. Vanadyl-nukleoside wurden nach (89) dargestellt und während der gesamten mtRNA Isolierung zu 10 mM zugesetzt.

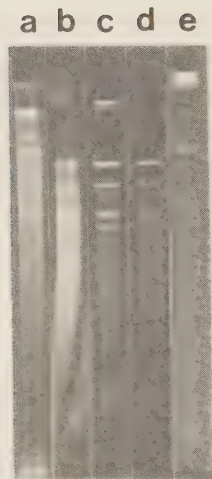


Fig.61 Vergleich der mtRNA Bandenmuster in vier verschiedenen Gelelektrophorese-Systemen .

SC 167 mtRNA wurde in Polyacrylamid-Gradientengelen (a), Agarosegelen (b), Harnstoff/Agarose-Gelen (c,d) und Formaldehyd/Agarose-Gelen (e) elektrophoretisiert und nach Anfärben mit EtBr photographiert. Polyacrylamid-Gradientengele (3-12 % Acrylamid, linear) wurden mit einem Puffersystem 50 mM Tris-ac pH 7.4/25 mM Na-ac/1 mM EDTA eingesetzt. Nicht denaturierende Agarosegele wurden mit 90 mM Tris-borat pH 8.3/2.5 mM EDTA verwendet. Harnstoff/Agarose- und Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophoresen wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Proben für die Elektrophoresen wurden zum einen mit Harnstoff (a,c), zum anderen mit Formaldehyd (d,e) bzw. gar nicht (b) denaturiert (s. Material und Methoden).

wünschter Effekt war , wurde in späteren Versuchen auf die Anwendung der Vanadyl nukleoside verzichtet .

Ein Vergleich der vier verschiedenen oben erwähnten Gelsysteme ist in Fig. 61 gezeigt . Daraus geht hervor , daß in nicht-denaturierenden Gelsystemen und nach Anfärbung mit EtBr nur in Polyacrylamid- nicht aber in Agarose-Gelen ein befriedigend deutliches Banden-Muster zu erkennen ist . In beiden Fällen war eine Harnstoff-denaturierte RNA-Präparation auf das Gel aufgetragen worden . Offensichtlicher Nachteil der nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese , selbst bei niederprozentigen Gelen , ist es jedoch , daß einmal im höhermolekularen Bereich keine gute Auftrennung mehr erfolgt , und daß zum anderen die konservierte Sekundärstruktur der verschiedenen RNA-Spezies keine Korrelation zwischen Wanderungsstrecke und Molekulargewicht zuläßt . Dieses wird erst möglich , wenn die Trenngele mit (vollständig denaturierendem) Formaldehyd oder mit (partiell denaturierendem) Harnstoff versetzt werden .

Die Auftragung einer Harnstoff-behandelten RNA-Präparation auf ein Harnstoff-haltiges Agarose-Gel , ist in Fig. 61 c gezeigt . Man sieht , daß in diesem Gelsystem sowohl von der Auflösung (Bandenschärfe) , als auch vom Trennbereich (Größenunterschiede) her eine sehr gute Auftrennung der verschiedenen RNA-Komponenten möglich ist . Es ist allerdings bekannt , daß die (größeren) 28 S und 18 S cytoplasmatischen rRNA-Spezies hier schneller wandern als die entsprechenden (kleineren) mitochondriellen 21 S und 15 S rRNA's (76) . Dies rührt daher , daß Harnstoff die RNA-Sekundärstruktur nicht vollständig und bei verschiedenen RNA-Spezies offensichtlich in unterschiedlichem Ausmaß aufhebt . Wird die RNA-Probe vor der Elektrophorese statt mit Harnstoff mit einem denaturierenden Formamid/Formaldehyd/Puffer-Gemisch (50:6.6:43.4) behandelt , so erhält man im Harnstoff/Agarose-System ebenfalls gut getrennte RNA-Banden . Entsprechende Bandenmuster können im Formaldehyd-haltigen Agarose-Gel durch EtBr-Anfärbung nicht sichtbar gemacht

werden (vgl. Fig. 61 e). Trotzdem werden mit dieser Methode offensichtlich auch scharf getrennte RNA-Banden erhalten, was durch "Northern" Hybridisierung mit einer spezifischen OXI 3-Probe gezeigt werden konnte (Fig. 62). Der Vergleich zwischen Harnstoff/Agarose- und Formaldehyd/Agarose-Gelen in einer solchen Versuchsanordnung zeigt sogar, daß das Formaldehyd/Agarose-System den Harnstoff/Agarose-Gelen hinsichtlich der Bandenschärfe noch überlegen ist.

Es wurden daher in allen folgenden Versuchen für "Northern" Hybridisierungs Experimente stets Formaldehyd/Agarose-Gele, für die Darstellung EtBr-gefärbter RNA-Muster jedoch Harnstoff/Agarose-Gele verwendet.

2. Untersuchung der Transkription des OXI 3-Bereiches und der Reifung von OXI 3-Transkripten.

Die Transkription des OXI 3-Bereiches erfolgt möglicherweise im Zusammenhang mit anderen, benachbarten Bereichen des mitochondriellen Genoms. Das primäre OXI 3-Transkript könnte z.B. eine polycistronische mRNA darstellen, welche sowohl OXI 3, wie auch OLI 2 und ein tRNA^{Glu}-Gen umfaßt. Experimentelle Hinweise für ein solches, zunächst sehr großes Transkript wurden von G. Faye und M. Simon erhalten (77). Die mitochondrielle DNA aus Säugetier-Mitochondrien wird primär in Form eines einzigen, zum gesamten Mitochondriengenom komplementären Transkriptes abgelesen (78). Die mitochondrielle DNA der Hefe enthält demgegenüber mehrere RNA-Polymerase Startstellen (mindestens 5). Ihre genaue Zahl ist allerdings noch nicht bekannt. Darüberhinaus konnte bisher keine einheitliche Promotorstruktur gefunden werden (79). Die Reifung der OXI 3-

mRNA wird daher u.U. aus zwei Abschnitten bestehen, einmal der Abtrennung anderer kodierender Sequenzen, und zum anderen aus dem Zusammenspleißen der verschiedenen OXI 3-Exons. Das OXI 3-Gen wurde im Hefestamm KL14-4A teilweise und im Hefestamm D 273-10 B vollständig sequenziert (16,18). Durch Vergleich dieser Sequenzdaten mit der bekannten Aminosäuresequenz des menschlichen OXI 3-Genprodukts (Cytochromoxidase Untereinheit I) wurden 7 Introns und 8 Exons im OXI 3-Gen des Stammes D 273-10 B identifiziert (16). Die vorliegenden Sequenz- und Restriktionsdaten des Stammes KL14-4A zeigen, daß die OXI 3-Sequenz, ebenso wie die Sequenzen anderer mtDNA-Bereiche in Hefe, Stamm-spezifisch polymorph sein kann. D.h. die Zahl der vorhandenen Introns kann variieren. In jedem Fall jedoch bleibt das OXI 3-Gen dasjenige mitochondrielle Gen in Hefe, welches die größte Zahl von Introns, d.h. die komplexeste Mosaikstruktur aufweist. Die Reifung der OXI 3-mRNA wird daher ein vielstufiger und wahrscheinlich eine Reihe von Spleiß-Enzymen benötigender Prozess sein.

Nachdem in Hefe-Mitochondrien zirkuläre und zu den großen OXI 3-Introns komplementäre RNA-Spezies nachgewiesen wurden (64), bleibt allerdings für das Herausschneiden einiger OXI 3-Introns auch ein nicht-enzymatischer Mechanismus denkbar, vergleichbar etwa dem für ein Intron der 26 S rRNA von *Tetrahymena thermophila* gefundenen Spleißmechanismus (80). Auf der anderen Seite wurden in mindestens vier OXI 3-Introns offene Leserahmen nachgewiesen (16). Diese können in Analogie zur Struktur des Cytochrom b-Gens und zur Reifung seines Transkriptes (13) für OXI 3 Transkript-spezifische Maturasen kodieren. Trotzdem bleibt eine Beteiligung Kern-kodierter Prozessier-Enzyme am Gesamtvorgang der OXI 3 Transkript-Reifung denkbar, wenn nicht wahrscheinlich. Das von Michaelis et.al. (60) nachgewiesene spezifische Fehlen von OXI 3 Genprodukt in einer Reihe von Kern-DNA Mutanten (pet) der Hefe, kann als deutlicher Hinweis auf die Existenz solcher Enzyme angesehen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mit Hilfe verschiedener ^{32}P -markierter DNA-Proben aus dem Bereich des OXI 3-Gens festzustellen, ob in den erwähnten, spezifisch Cytochromoxidase Untereinheit I defekten Kernmutanten, im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche OXI 3 Transkriptmuster vorliegen. Denkbar war, daß in Abwesenheit bestimmter, Kern-kodierter Maturasen nicht nur das Endprodukt, die reife mRNA, in den Mutanten fehlt, sondern daß es auch gelingt, anhand der sich anhäufenden Zwischenprodukte Aussagen über die jeweils blockierte Reaktion und möglicherweise auch über die Reihenfolge der verschiedenen Prozessierungsschritte zu machen.

Es wurden drei verschiedene Hybridisierungsproben eingesetzt (vgl. auch Fig. 56) :

- (1) ein durch präparative Agarosegel-Elektrophorese isoliertes EcoRI-Fragment (RR10) aus dem Bereich der Exons 6, 7 und 8 sowie der Introns 6 und 7 (Fragment a in Fig. 63). Da die Introns 6 und 7 so klein sind (21 bzw. 45 bp), daß sie in isoliertem Zustand unter den hier verwendeten Elektrophoresebedingungen nicht nachweisbar waren (aus dem Gel herausgewandert), stellte die Probe a eine reine Exon-Probe dar.
- (2) ein kloniertes EcoRI/HindIII-Fragment aus dem Bereich der Exons 3 und 4, sowie der Introns 2, 3 und 4 (vgl. Fragment b in Fig. 63).
- (3) ein kloniertes EcoRI-Fragment aus dem Bereich von Intron 2 (vgl. Fragment c in Fig. 63).

Im Unterschied zu Probe a sollte Probe b außer mit allen Exon-haltigen RNA-Zwischenstufen auch mit den ausgeschnittenen Introns 2, 3, 4 und – auf Grund seiner Sequenzhomologie zu Intron 2 (16) – auch mit Intron 1 hybridisieren. Probe c schließlich sollte nur mit den Introns 1 und 2 – seien sie ausgeschnitten oder noch in bestimmten Zwischenstufen integriert – reagieren.

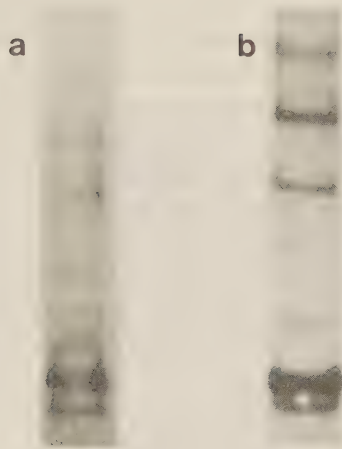


Fig.62 Vergleich der "Northern" Hybridisierungen von mtRNA nach Transfer aus zwei verschiedenen Elektrophorese-Systemen .

SC 167 mtRNA wurde in einem Harnstoff/Agarose- (a) sowie in einem Formaldehyd/Agarose-Gel (b) elektrophoretisiert und wie in Material und Methoden beschrieben mit einer OXI 3 mtDNA-Probe (b in Fig.63) hybridisiert.

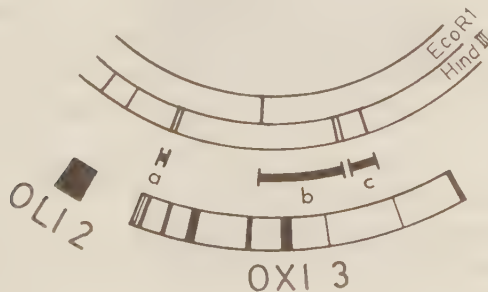


Fig.63 Zur "Northern" Hybridisierung eingesetzte OXI 3 mtDNA-Proben .

Die hier eingezeichneten und im Text näher beschriebenen KL14-4A mtDNA-Fragmente aus dem OXI 3-Bereich (a,b und c) wurden zur "Northern-blot" Analyse der mtRNA's von pet-ts Mutanten eingesetzt.

Es wurden mit den aufgeführten Proben die mitochondriellen RNA's aus insgesamt 65 verschiedenen pet-ts Mutanten untersucht. Die Mutanten vertraten jeweils eine einzelne, spezifische Komplementationgruppe. Sie waren vor der RNA-Extraktion zunächst unter permissiven Bedingungen (1% Galaktose, 22°C) und dann für 12 hr unter nicht-permissiven Bedingungen (1% Galaktose, 36°C) kultiviert worden. Unter denselben Bedingungen waren von Michaelis et.al.(60) die charakteristischen Ausfälle der Synthese bestimmter mitochondrieller Translationsprodukte in diesen Mutanten nachgewiesen worden. Bei den untersuchten Mutanten handelte es sich ausschließlich um solche, bei denen die Cytochromoxidase Untereinheit I (OXI 3-Genprodukt) entweder spezifisch oder zusammen mit der Untereinheit II fehlte. Auf Grund der erwähnten proteinchemischen Befunde wurde davon ausgegangen, daß die gewählten experimentellen Bedingungen ausreichten, die in den Zellen zunächst noch vorhandene reife OXI 3-mRNA soweit auszuverdünnen oder abzubauen, daß sie mit der hier durchgeführten Analyse nicht mehr interferierte.

Die Autoradiogramme der "Northern-blot" Analyse von 16 Mutanten mit der Probe a, 52 Mutanten mit der Probe b und 27 Mutanten mit der Probe c sind in Fig.64-66 dargestellt. Wie man sieht, können die beobachteten Hybridisierungsmuster grundsätzlich in jeweils drei Gruppen zusammengefaßt werden:

- (i) Mutanten, welche keinen Unterschied zum Wildtyp RNA-Muster aufweisen (ca.38);
- (ii) Mutanten, welche im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien deutlich andersartige OXI 3-Transkriptmuster zeigen (ca.41);
- (iii) Mutanten, welche überhaupt keine hybridisierenden RNA-Banden mehr enthalten (ca.16).

Insbesondere der letztgenannte Effekt wird sicher in manchen Fällen auch auf experimentelle Unzulänglichkeiten, etwa zu geringer Probenauftrag, zurückzuführen sein, sodaß vor einer endgültigen quantitativen Bewertung der Ergebnisse noch

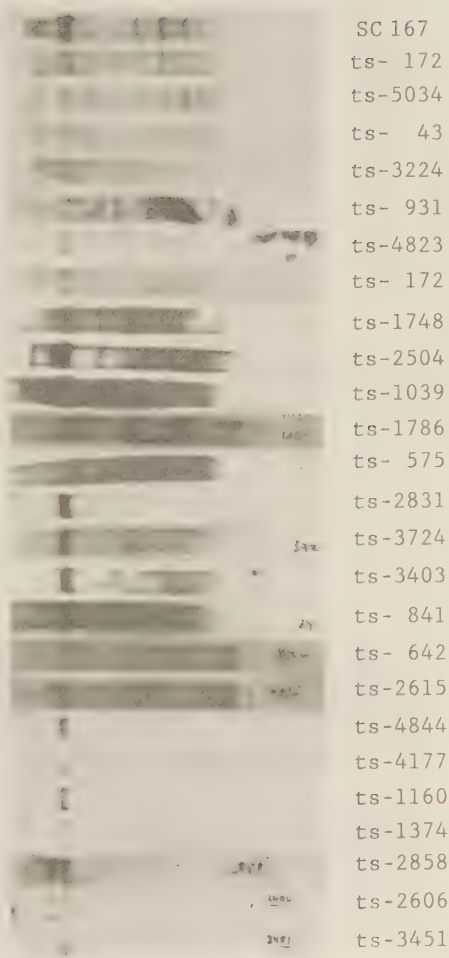


Fig.64 "Northern-blot" Analyse der mtRNA aus pet-ts Mutanten unter Verwendung der mtDNA-Probe b .

mtRNA aus Wildtyp (SC 167) und pet-ts Mutanten wurde isoliert, in 0.8% Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophoretisiert, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit der OX1 3 mtDNA-Probe b (vgl. Fig.63) hybridisiert wie in Material und Methoden beschrieben.

Fig. 64 (Fortsetzung)

	ts-2345
	ts-3088
	ts-1628
	ts- 456
	ts-2571
	ts-4808
	ts-2764
	ts-3722
	ts-1572
	ts-1224
	ts- 621
	ts-3281
	ts- 645
3201	ts-3201
	ts-2571
	ts-1080
	ts-1930
149	ts-1475
	ts- 371
	ts- 226
320	ts-3200
3169	ts-3160
	ts-1689
	ts- 234
	ts-2977

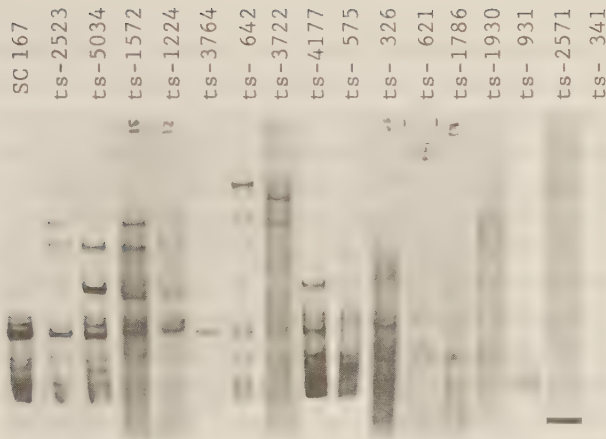


Fig.65 "Northern-blot" Analyse der mtRNA aus pet-ts Mutanten unter Verwendung der mtDNA-Probe a .

Bzgl.Einheiten der Versuchsdurchführung vgl.Legende Fig.64 sowie Material und Methoden.

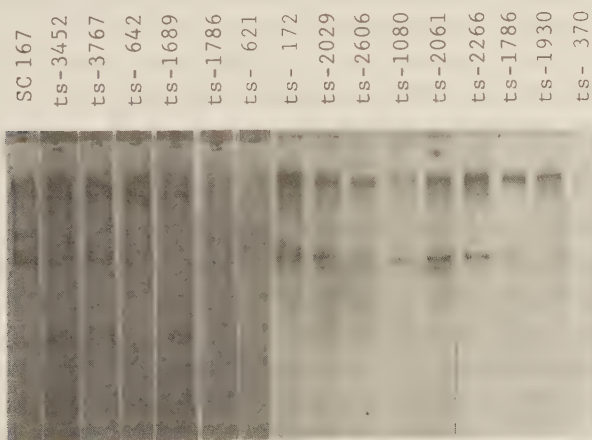


Fig.66 "Northern-blot" Analyse der mtRNA aus pet-ts Mutanten unter Verwendung der mtDNA-Probe c .

In dieser Fig. sind die Autoradiogramme von "Northern-blot" Hybridisierungen gezeigt, denen 1.5 % Formaldehyd/Agarose-Gele zugrunde lagen.Bzgl.weiterer Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl.Legende Fig.64 sowie Material und Methoden.

zusätzliche , bestätigende Experimente nötig sein werden . Im Falle der Bestätigung werden zwei Möglichkeiten zu diskutieren sein : einmal ein allgemeiner Ausfall der Transkription mitochondrieller DNA als Ganzes , und zum anderen ein vollständiger aber spezifischer Ausfall der Transkription des OXI 3 Gens . Die erste Möglichkeit , weniger gut allerdings die zweite , kann mit Veränderungen der Kern-kodierten mitochondrialen RNA-Polymerase erklärt werden . Da die Hefe-mtDNA offenbar keine allgemeine Promotorsequenz besitzt ist es durchaus denkbar , daß die mitochondrielle RNA-Polymerase verschiedene Erkennungsstellen für die verschiedenen Transkriptionseinheiten besitzt , sodaß eine mutationsbedingte Veränderung einer dieser Erkennungsstellen zum spezifischen Ausfall der Synthese nur einer bestimmten RNA-Spezies führen könnte . Daß nicht nur die erste , sondern auch diese zweite Möglichkeit realisiert ist , darauf deutet der Befund hin , daß die Mutante ts-456 auf der einen Seite keine mit OXI 3-DNA hybridisierenden Transkripte aufweist , daß sie aber bei der gelelektrophoretischen Analyse ihrer mitochondrialen Gesamt-RNA ein praktisch wildtypartiges Bandenmuster zeigt (Daten nicht gezeigt) . Mutanten mit wildtypartigem OXI 3-Transkriptmuster , auf der anderen Seite , dürften ihren genetischen Defekt eher auf Translations-ebene , und nicht bei der mRNA-Synthese bzw. Reifung , haben .

Die relativ wenigen Mutanten , welche einen im Vergleich zum Wildtyp deutlichen Unterschied hinsichtlich ihrer OXI 3-Transkripte aufwiesen , sind der Übersichtlichkeit halber noch einmal in Fig. 67 zusammengefaßt . Hybridisiert mit den beiden Exon-haltigen Proben a und b zeigt der Wildtyp 8-9 deutlich erkennbare OXI 3-Transkripte bzw. Transkriptreifungs-Zwischenprodukte im Längenbereich zwischen 2.2 und 8.3 kb . Theoretisch sollte das Original-Transkript mindestens 12 kb und die reife mRNA 1.9 kb lang sein . Zusätzlich zeigt Hybridisierungsprobe b , wie die Intron 1/2 spezifische Hybridisierungsprobe a ausschließlich , zwei Banden im Bereich der herausgeschnittenen Introns 1 und 2 . Daß Probe a hier ebenfalls eine , wenn auch schwache , Hybridisierung zeigt , ist theoretisch unerwartet

und könnte somit auf bisher noch nicht bekannte Sequenzhomologien in den betreffenden DNA-Bereichen hindeuten. Besonders deutlich tritt das Wildtyp-Bandenmuster in der Mutante ts-2571 zutage, wobei einige Banden, die im Wildtyp kaum erkennbar sind, hier ebenfalls klar hervortreten (Fig.67).

Vom Wildtyp stark abweichende Muster zeigen mit Hybridisierungsprobe b die Mutanten ts-1224, ts-1572 und ts-621. In diesen Mutanten ist reife mRNA nicht oder nur kaum erkennbar und hochmolekulare Vorstufen stellen den Hauptteil der mit OXI 3 DNA hybridisierenden Transkripte dar. Die Mutanten ts-1224 und ts-1572 zeigen ein nahezu identisches, ts-621 ein davon verschiedenes Bandenmuster. In allen drei Mutanten scheint der mRNA-Reifungsprozess auf einer relativ frühen Stufe aufgehalten zu sein. Trotzdem wurde Intron 1 bei ts-1572 und ts-621 möglicherweise schon herausgeschnitten. ts-1224 wäre mit höheren Substanzmengen, die beiden anderen Mutanten durch längere Kultivation bei nicht-permissiver Temperatur, daraufhin noch einmal genauer zu überprüfen. Die bei ts-621 als Hauptbande beobachtete RNA-Spezies ist mit 11.2 kb größer als die größte im Wildtyp nachweisbare mRNA-Vorstufe. Möglicherweise handelt es sich hier um das Original-Transkript selbst oder um eines seiner ersten Folgeprodukte. Andeutungsweise erkennbare kleinere, aber immer noch hochmolekulare RNA-Spezies könnten u.a. durch Abspaltung von Intron 1 (schwach sichtbar) daraus hervorgegangen sein. Damit erscheint eine durch ein Kern-kodiertes Enzym eingeleitete Transkriptreifungs-Sequenz – wie sie ähnlich für die Cytochrom b mRNA beschrieben ist – auch für die Cytochromoxidase Untereinheit I denkbar. Bei den Mutanten ts-1572 und ts-1224 kommt der Reifungsprozess offensichtlich erst auf einer späteren Stufe, bei einem Zwischenprodukt von etwa 7.2 kb Länge, zum Stillstand. Abgesehen von der möglicherweise erfolgten Abspaltung von Intron 1 geben die Gelmuster keine eindeutigen Anhaltspunkte hinsichtlich Zahl und Art der zwischen zeitlich erfolgten Reifungsschritte. Auf Grund des Größenunterschiedes zum Transkript in ts-621 kommen allerdings nicht mehr als 2-3 Spleiß-

Reaktionen dazwischen in Frage. Unbefriedigend bleibt bei dieser Interpretation, daß dieselben drei Mutanten, wenn sie mit Probe a hybridisiert wurden, nicht dieselben Transkriptmuster zeigten (Fig.67). Mit Ausnahme des Fehlens der reifen mRNA waren die Bandenmuster hier wildtypähnlich. Es bleibt möglich, daß in der dabei verwendeten RNA-Präparation der Mutanten-Charakter durch experimentelle Mängel nicht ausreichend zur Ausprägung gebracht worden war.

Bei Verwendung der Hybridisierungsprobe a weisen die Mutanten ts-3722, ts-642 und ts-5034 deutliche, zumeist jedoch nur quantitative Unterschiede zum Wildtyp auf. In allen Mutanten ist reife mRNA, wenn auch nur als schwache Bande, erkennbar. Die Hauptbande hat bei ts-5034 eine Größe von ca. 3.2 kb und bei ts-3722 und ts-642 von 8.3 kb. Daß daneben noch viele weitere, zumeist Wildtyp-artige Banden erkennbar sind, könnte mit dem temperatur-sensitiven, d.h. zur "leakyness" neigenden Phänotyp der Mutanten zusammenhängen. Bei ts-5034 wurde außerdem ein Revertanten-Anteil von 10 % in der zur RNA-Präparation benutzten Zellkultur gemessen (Tab.13). Die 8.3 kb Bande könnte dieselbe Zwischenstufe darstellen, deren Ansammlung auch in den Mutanten ts-1572 und ts-1224 beobachtet wurde. Ob die Verstärkung der 3.2 kb Bande in ts-5034 ursächlich mit dem Mutanten-Phänotyp zusammenhängt, muß angesichts der deutlich vorhandenen Bande von ausgereifter mRNA offen bleiben, Hybridisation der ts-3722 und ts-5034 RNA's mit Probe b führte zu praktisch denselben Bandenmustern wie mit Probe a (Fig.67).

Die beschriebenen Daten führen zu dem Schluß, daß ca. 5 der von uns untersuchten pet-ts Mutationen erkennbar mit dem Reifungsprozess der OXI 3-Transkripte interferieren. Die 5 genannten Mutanten weisen 3 unterschiedliche Phänotypen auf. In allen Fällen häufen sich hochmolekulare Zwischenprodukte an. Demnach scheinen Kern-kodierte Funktionen vor allem bei den frühen Schritten, möglicherweise sogar dem ersten Schritt der OXI 3-Transkriptreifung eine Rolle zu spielen.

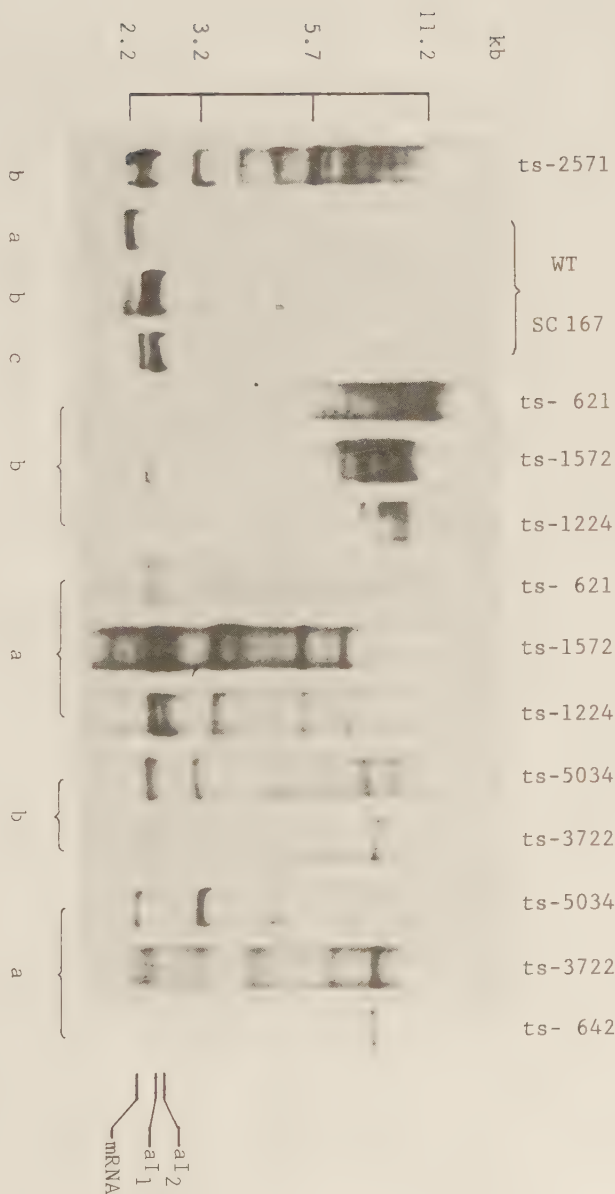


Fig. 67 Nachweis von Transkriptions-Defekten in pet-ts Mutanten mit spezifischem Cytochromoxidase Untereinheit I Defekt.

Autoradiogramme der "Northern-blot" Hybridisierungen von mRNA's aus pet-ts Mutanten die einen spezifischen Defekt in der Synthese der Cytochromoxidase Untereinheit I aufwiesen. Hybridisiert wurde jeweils mit den in Fig. 63 gezeigten OXI 3 mtDNA-Proben a, b und c. Angegeben sind weiter die Positionen der reifen OXI 3 mRNA sowie der Introns a₁ und a₂. Die Größen einiger prominenter Transkripte wurden durch Vergleich mit ³²P-endmarkierten λ -DNA Hind III-Fragmenten, die in parallelen Bahnen des Agarosegels elektrophoretisch worden waren, ermittelt. Bzgl. Einzelheiten der Versuchsdurchführung vgl. Material und Methoden.

3.mtDNA Transkription in pet-ts Mutanten mit vollständig oder partiell defekter mitochondrieller Proteinsynthese.

Phänotypische Defekte der mitochondriellen Proteinsynthese können grundsätzlich durch Defekte im Transkriptions- oder Translations-Apparat der Mitochondrien verursacht werden. Spezifische Defekte der Transkription einzelner Strukturgene müssen durch Verwendung geeigneter DNA-Fragmente als Hybridisierungsproben untersucht werden, da sich Veränderungen im Anteil der einzelnen mRNA's an der gesamten mtRNA sicherlich im Elektrophorese-Muster der Gesamt-mtRNA kaum offenbaren werden. Im vorhergehenden Abschnitt wurden derartige Hybridisierungsexperimente für das OXI 3-Gen beschrieben. Grundlegende Störungen der RNA-Synthese in Mitochondrien, etwa infolge einer mutationsbedingten Inaktivierung der RNA-Polymerase Aktivität, sollten dagegen in sichtbaren Veränderungen des mtRNA-Musters dieser Mutanten in Elektrophorese-Gelen deutlich werden. Auf Grund der deutlichen Sichtbarkeit der beiden rRNA-Banden in EtBr-gefärbten RNA-Gelen sollten insbesondere entsprechende Defekte der Synthese dieser beiden RNA-Arten hierbei erkennbar werden. Zur gelelektrophoretischen Untersuchung wurde die mtRNA der interessierenden Mutanten jeweils aus gereinigten Mitochondrienpräparationen isoliert und vor der Elektrophorese entweder mit 5 M Harnstoff oder mit 50 % Formamid/2.2 M Formaldehyd denaturiert. Das zur Auftrennung benutzte Gelsystem war in allen Fällen gleich und enthielt ebenfalls 5 M Harnstoff. Alle Mutanten waren vor der Analyse 12-14 hr bei nicht-permissiver Temperatur (36 °C) in 1 % Galaktose-haltigem Nährmedium gezüchtet worden. Dies sind dieselben Bedingungen, unter denen die von Michaelis (60) beobachteten Defekte in der Synthese bestimmter mitochondriell kodierter Proteine aufgetreten waren. Tab.13 gibt für die einzelnen untersuchten Mutanten an, wieviele Teilungen jeweils bei nicht-permissiver

Tab.13 pet-ts Mutantenstämme aus denen mtRNA für Transkriptionsuntersuchungen isoliert worden war.

Angegeben sind: Bezeichnung des Hefestammes, Art des Proteinsynthese-Defektes (=-fehlende Proteinsynthese, oxi3=Cytochromoxidase Untereinheit I wird nicht synthetisiert, oxi2=Cytochromoxidase Untereinheit III wird nicht synthetisiert, oxi1=Cytochromoxidase Untereinheit II wird nicht synthetisiert, b=Apocytochrom b wird nicht synthetisiert, var=var-Genprodukt wird nicht synthetisiert), T=Anzahl der Teilungen bei nicht-permissiver Temperatur, gew=Feuchtgewicht der geernteten Hefezellen, R=Anteil von Revertanten in %, rho=Anteil von rho⁻-Mutanten in %, A=Ausbeute an mt-Nukleinsäuren in mg.

Hefestamm	Defekt	T	gew g	R %	rho %	A mg
SC 167		4.4	9.1	0	0	0.5
ts- 43	oxi3	4.3	3.0	0	0	0.2
ts- 172	oxi3	5.1	5.5	1	0	0.6
ts- 226	oxi3	3.2	3.8	21	0	0.6
ts- 234	oxi3/1	2.0	3.5	0	0	0.1
ts- 297	oxi3/1	0.8	4.6	0	0	0.2
ts- 310	oxi3/1	2.3	21.0	0	0	1.5
ts- 326	oxi3/1	4.5	5.4	1	0	0.2
ts- 337	oxi3	0	0	0	0	0
ts- 353	-	1.5	2.9	1	25	0.3
ts- 360	oxi3/1	5.4	8.1	8	0	0.7
ts- 370	oxi3/1	6.0	2.1	0	0	0.2
ts- 371	oxi3	3.5	3.2	0	0	0.4
ts- 456	oxi3/1	2.3	9.0	68	0	0.2
ts- 491	-	2.1	3.7	0	0	0.3
ts- 575	-	3.7	5.3	0	0	0.6
ts- 611	oxi3	2.6	4.6	0	0	0.5
ts- 621	oxi3/1	5.2	4.2	0	0	0.2
ts- 642	oxi3	4.0	7.3	0	0	0.8
ts- 645	oxi3/1	4.1	6.0	4	14	0.6
ts- 752	oxi3/1	4.7	8.0	0	20	0.5
ts- 758	oxi3/1	4.0	8.0	0	0	0.5
ts- 794	oxi3	2.1	2.3	0	36	0.2

Tab.13 (Fortsetzung)

Hefestamm	Defekt	T	gew g	R %	rho %	A mg
ts- 822	-	1.6	2.3	0	13	0.1
ts- 841	oxi3/1	3.1	6.2	20	0	0.5
ts- 841	oxi3/1	3.2	5.0	10	0	0.7
ts- 852	oxi3/1	2.9	4.0	0	58	0.3
ts- 876	oxi1	2.4	8.2	0	0	0.3
ts- 931	oxi3	3.3	6.7	0	0	0.6
ts-1039	oxi3/1	4.1	8.2	80	0	0.8
ts-1046	oxi3	5.8	2.6	0	96	0.1
ts-1080	oxi3	1.4	2.7	0	0	0.2
ts-1113	oxi3/1	2.5	15.0	0	16	1.4
ts-1121	oxi3	3.2	8.8	20	0	1.7
ts-1147	oxi3/1	2.3	2.1	0	70	0.1
ts-1160	oxi3/1	3.5	2.9	7	7	0.4
ts-1186	oxi3	1.1	2.7	0	0	0.5
ts-1224	oxi3/1	5.8	7.2	21	0	0.5
ts-1242	oxi3/1	1.6	3.5	0	0	0.1
ts-1369	oxi3/1	4.7	7.1	0	0	0.5
ts-1374	-	2.1	1.8	60	0	0.1
ts-1402	oxi3/1	3.1	9.0	0	2	0.4
ts-1475	oxi3/1	0.8	2.1	0	0	0.2
ts-1572	oxi3/1	4.9	9.9	1	0	1.3
ts-1628	oxi3	6.4	5.7	10	0	0.9
ts-1628	oxi3	5.1	9.7	80	0	1.1
ts-1666	-	3.0	7.0	0	32	1.4
ts-1689	oxi3	4.3	8.2	0	0	0.7
ts-1749	oxi3/1	3.5	8.2	28	0	1.0
ts-1786	oxi3	4.2	8.1	0	0	0.9
ts-2016	-	0.8	1.6	2	3	0.4
ts-2061	oxi3	2.9	9.9	0	0	1.6
ts-2061	oxi3	2.9	7.8	0	0	0.6
ts-2092	oxi3	3.2	8.6	0	2	1.2
ts-2168	-	2.9	9.5	0	0	0.9

Tab.13 (Fortsetzung)

Hefestamm	Defekt	T	gew g	R %	rho %	A mg
ts-2256	-	1.8	3.2	0	16	0.2
ts-2266	oxi3	4.7	6.9	3	0	1.1
ts-2341	oxi3/1	5.0	3.3	0	0	0.4
ts-2345	var	3.4	5.0	45	20	0.3
ts-2256	-	2.8	4.3	0	4	0.3
ts-2403	oxi1	2.3	15.0	0	0	1.0
ts-2504	oxi1	2.1	3.1	90	0	0.3
ts-2523	oxi3	3.4	2.4	0	0	0.3
ts-2555	-	3.6	9.0	0	0	0.6
ts-2571	oxi3	1.9	1.9	50	1	0.3
ts-2571	oxi3	5.3	14.1	30	0	1.0
ts-2603	oxi3	4.1	10.9	1	1	1.3
ts-2606	oxi3	1.9	8.0	0	0	1.4
ts-2610	-	5.2	4.7	0	0	0.4
ts-1048	oxi3	3.4	6.5	0	2	0.4
ts-2615	oxi3/1	3.3	8.2	0	0	0.5
ts-2615	oxi3/1	3.1	4.7	2	0	0.4
ts-1930	oxi3	5.1	7.8	0	0	0.4
ts-2639	oxi3	4.0	4.4	1	0	0.2
ts-2686	oxi3	3.5	4.2	0	0	0.1
ts-2764	oxi3/1	4.5	5.9	0	0	0.6
ts-2764	oxi3/1	7.4	3.6	0	0	0.6
ts-2831	-	4.2	4.4	2	3	0.4
ts-2866	oxi3/1	3.2	4.0	0	0	0.2
ts-2897	-	0.8	3.5	0	0	0.3
ts-3088	oxi3	3.6	5.0	5	0	0.5
ts-3160	oxi3	3.2	6.5	18	0	1.6
ts-3160	oxi3	5.2	2.1	0	1	0.7
ts-3200	b	1.0	1.5	0	20	0.2
ts-3201	-	2.6	5.2	0	85	0.6
ts-3206	oxi1	1.8	7.3	0	0	0.3
ts-3215	oxi3	1.8	7.4	0	0	1.7
ts-3224	-	2.7	5.1	0	0	0.5

Tab.13 (Fortsetzung)

Hefestamm	Defekt	T	gew g	R %	rho %	A mg
ts-2977	-	3.0	4.3	12	8	0.8
ts-3250	oxi3	0.8	2.7	0	1	0.3
ts-3281	oxi3	3.0	4.9	0	6	0.7
ts-3332	oxi3/1	4.9	3.3	10	8	0.2
ts-3334	oxi3	2.9	6.2	0	40	0.6
ts-3411	oxi3	3.6	8.1	0	3	1.2
ts-3418	var	3.1	4.6	0	99	0.3
ts-3451	oxi3	1.0	2.5	0	29	0.1
ts-3492	oxi3/1	3.1	7.0	0	0	0.3
ts-3492	oxi3/1	2.8	15.0	0	5	2.2
ts-3504	b	4.2	7.2	0	0	0.5
ts-3573	oxi3/1	5.0	6.8	0	0	0.4
ts-3722	oxi3/1	5.2	8.2	0	0	0.3
ts-3722	oxi3/1	6.1	6.6	0	0	0.7
ts-3724	oxi3/1	4.2	12.5	0	50	0.9
ts-3724	oxi3/1	3.5	9.7	0	30	1.0
ts-3736	oxi3	2.7	6.2	0	0	0.5
ts-3745	oxi3	2.4	8.1	0	0	1.1
ts-3762	oxi3/1	4.6	7.3	0	0	0.6
ts-3767	oxi3	5.1	7.1	0	0	0.6
ts-3767	oxi3	3.0	8.7	0	0	0.7
ts-4177	oxi3/1	4.2	14.0	2	0	1.0
ts-4246	oxi3	1.9	7.6	0	0	2.6
ts-4304	oxi3	3.3	4.9	7	0	0.4
ts-4683	oxi3	4.0	2.0	0	0	0.1
ts-4808	oxi3/1	5.1	7.2	0	0	0.3
ts-4808	oxi3/1	6.0	7.8	30	0	0.6
ts-4823	oxi3	2.5	5.8	0	0	0.7
ts-4844	oxi3	4.0	5.2	19	0	0.6
ts-5034	oxi3	2.0	4.1	10	0	0.7

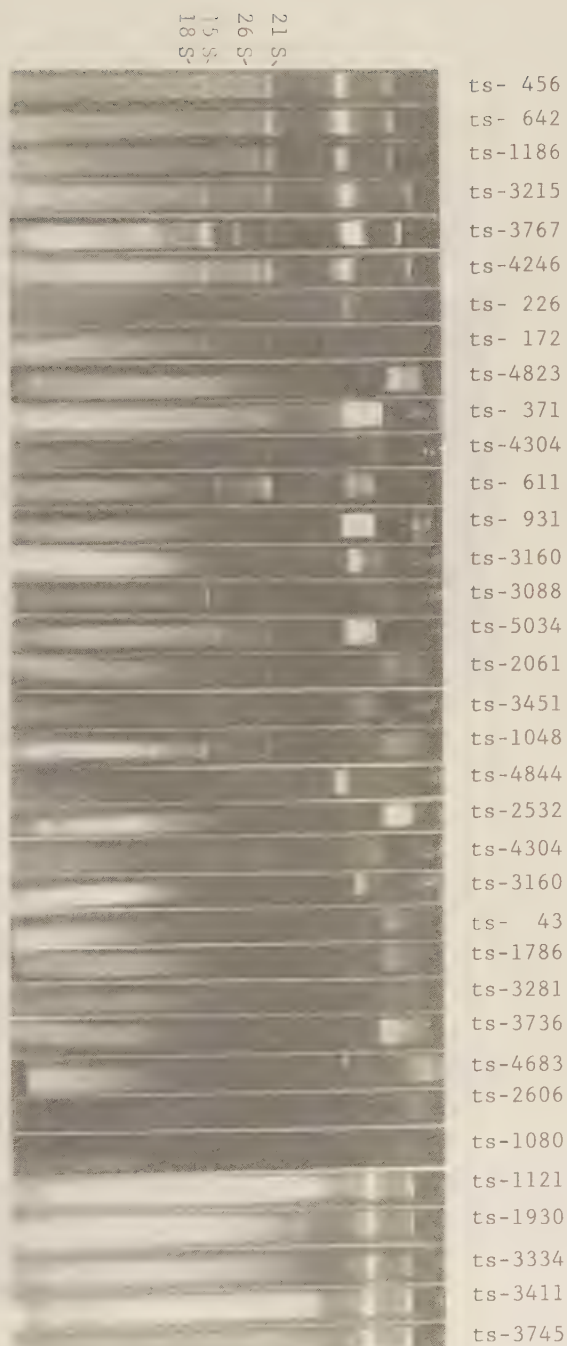


Fig. 68

Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus pet-ts Mutanten die spezifisch Cytochrom-oxidase Untereinheit I defekt waren.

ts-Mutanten wurden 12 hr bei 36°C in 1% Galaktose, 1% Hefeextrakt, 1% Pepton und je 0.01% Adenin und Guanosin gezüchtet. Isolation der mtRNA und Durchführung der Elektrophorese in Harnstoff/Agarose-Gelen sind in Material und Methoden beschrieben.

21 S
20 S
15 S
18 S



ts- 310
ts- 752
ts-1369
ts-1402
ts-2092
ts-2615
ts-3332
ts- 758
ts- 370
ts-3724
ts-3762
ts-1749
ts- 852
ts-1628
ts- 297
ts-4808
ts-1147
ts-4177
ts-3722
ts-1572
ts-3418
ts-1160
ts-1113
ts- 621
ts- 645
ts-1175
ts-1172
ts- 784
ts-3573
ts- 360
ts-2866
ts- 841
ts-3402

Fig. 69

Elektrophorese-Bandenmuster von *mlnA*'s aus *ts*-ts Mutanten des *Herpesvirus* *chromoxidase* Untereinheit I und II defekt waren.

ts-Mutanten wurden 12 hr bei 30°C in I-Galaktose, 1 Moleküll/l, 10 µg/ml 0.01 Adenin und Guansin (geschützt, Isolation von *mlnA* und Nachprüfung der Elektrophorese in Harnstoff-Agarose-gelen sind in Material und Methoden beschrieben.

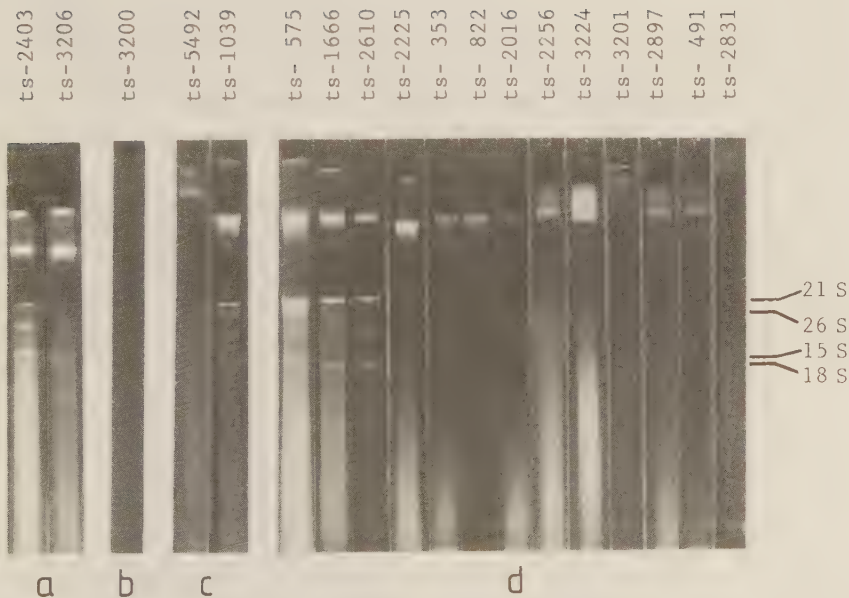


Fig.70 Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus pet-ts
Mutanten die einen spezifischen Defekt aufwiesen, (a)
der Cytochromoxidase Untereinheit II, (b) des Cyto-
chroms b, (c) des var-Proteins und (d) der gesamten
mitochondriellen Proteinsynthese.

ts-Mutanten wurden 12 hr bei 36°C in 1% Galaktose, 1% Hefeextrakt, 1% Pepton und je 0.01% Adenin und Guanosin gezüchtet. Isolation der mtRNA und Durchführung der Elektrophorese in Harnstoff/Agarose-Gelen sind in Material und Methoden beschrieben.

Temperatur noch stattgefunden hatten, wieviele Revertanten die abgeerntete Kultur enthielt und wie hoch der Anteil an rho⁻-Mutanten in ihr war. Man sieht, daß die pet-ts Mutanten sich nach der Temperaturerhöhung noch zwischen 1 und 7 mal geteilt hatten, wobei der Durchschnitt etwa bei 3 Teilungen lag. Weiterhin war in 80 % der Fälle der Revertantenanteil in der Kultur unter 10 %. War er höher so wurde dies bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Rho-negative Mutanten hatten sich in den meisten Kulturen keine gebildet. Falls dies der Fall war, konnten diese Daten bei der RNA-Muster Auswertung ebenfalls mit herangezogen werden. Die Bestimmung der RNA-Menge in den einzelnen Präparationen diente dazu, die RNA-Konzentration in allen Proben einheitlich auf denselben Wert (2 mg/ml) einzustellen.

Wie schon erwähnt, wiesen alle in dieser Arbeit untersuchten pet-ts Mutanten einen durch die Untersuchungen von Michaelis (60) deutlich gewordenen Ausfall der Synthese eines oder mehrerer mitochondrieller Translationsprodukte auf. Auf Grund der Gleichartigkeit ihrer Defekte wurden in der hier beschriebenen Versuchsreihe die Mutanten in drei verschiedene Gruppen unterteilt: Die größte Gruppe ist die der Cytochromoxidase Untereinheit 1/2 doppelt defekten Mutanten, gefolgt von solchen mit einem spezifischen Cytochromoxidase Untereinheit 1 Defekt, bzw. von Mutanten mit einem vollständigen Ausfall aller mitochondriell kodierter Polypeptide. Fig. 68-70 zeigt in der genannten Gruppeneinteilung, die EtBr-gefärbten Gelmuster der mtRNA's aller untersuchten pet-ts Mutanten. Man erkennt in allen drei Gruppen grundsätzlich drei verschiedene Arten von Bandenmustern: Wildtyp-artige Muster, Mutanten ohne erkennbare RNA-Banden und solche, in denen nur die beiden prominenten rRNA-Banden ohne den sonst sichtbaren Hintergrund vielfältiger sonstiger Transkripte hervortreten. In wenigen Ausnahmefällen wurden auch noch vom Wildtyp abweichende rRNA-Transkriptmuster beobachtet. Diese Mutanten sind in Fig. 71 noch einmal gesondert zusammengefaßt. Man beobachtet hier die

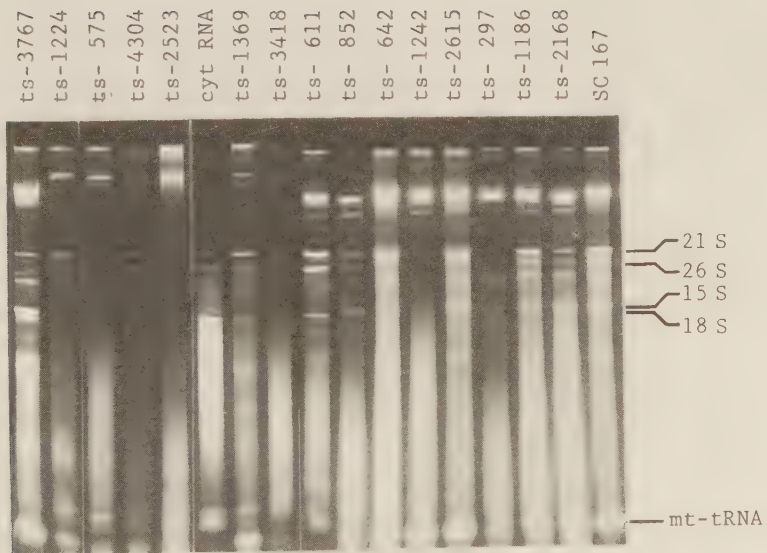


Fig.71 Elektrophorese-Bandenmuster von mtRNA's aus Wildtyp (SC 167) und ausgewählten pet-ts Mutanten.

ts-Mutanten wurden 12 hr bei 36°C in 1% Galaktose, 1% Hefeextrakt, 1% Pepton und je 0.01% Adenin und Guanosin gezüchtet. Isolation der mtRNA und Durchführung der Elektrophorese in Harnstoff/Agarose-Gelen sind in Material und Methoden beschrieben.

folgenden Abweichungen vom Wildtyp-Muster :

- (i) Spezifischer Verlust der 21 S rRNA bei Mutante ts-2523 (Gr.266). Nicht-ribosomale RNA's sind, falls überhaupt, nur in geringer Menge vorhanden. Die 15 S rRNA ist deutlich sichtbar. Die Mutante zeigt einen Defekt in der Synthese von Cytochromoxidase Untereinheit 1.

Spezifische Verringerung der Menge an 21 S rRNA im Verhältnis zur 15 S rRNA bei den Mutanten ts-2168 (Gr. 42), ts-3767 (Gr.11), ts-575 (Gr.49). Möglicherweise gehört auch ts-1242 (Gr.203a) zu diesem Typ von Mutanten, obwohl die geringe aufgetragene Probenmenge eine eindeutige Interpretation erschwert. Die Mutanten ts-2168 und ts-3767 enthielten normale Mengen, ts-575 und ts-1242 nur sehr geringe Mengen nicht-ribosomaler RNA. ts-2168 und ts-575 besaßen einen generellen Defekt der mitochondriellen Proteinsynthese, während ts-1242 und ts-3767 einen Defekt in der Synthese der Cytochromoxidase Untereinheit 1 und 2 aufwiesen.

- (ii) Spezifischer Verlust der 15 S rRNA in den Mutanten ts-611 (Gr.272) und ts-1369 (Gr.55). In beiden Fällen ist die 21 S rRNA deutlich vorhanden, die Menge der nicht-ribosomalen RNA ist stark verringert. Als proteinchemische Defekte waren ein Fehlen der Cytochromoxidase Untereinheit 1 (ts-611) bzw. 1 und 2 (ts-1369) festgestellt worden.

Spezifische Verringerung der 15 S rRNA in den Mutanten ts-642 (Gr.46), ts-1186 (Gr.279), ts-1224 (Gr.76) und evtl. auch ts-2615 (Gr.200a). In den meisten Mutanten dieses Typs erscheint das Muster nicht-ribosomaler RNA gegenüber dem Wildtyp unverändert. Die betrachteten Enzymdefekte bestanden in einem Verlust oder einer Veränderung von Cytochromoxidase Untereinheit 1 (ts-1186 bzw. ts-1224) oder im Verlust von Cytochromoxidase Untereinheit 1 und 2 (ts-642 und ts-2615).

- (iii) Beide rRNA's fehlen, zusammen mit praktisch allen

übrigen mtRNA's , in der Mutante ts-3418 (Gr.79a). Ihr Phänotyp war der eines Cytochromoxidase Untereinheit 1 defektes gewesen .

- (iv) Nicht-ribosomale RNA's fehlen , während 15 S und 21 S rRNA-Banden noch deutlich sichtbar sind , in den Mutanten ts-4304 (Gr.83c) und ts-852 (Gr.79c). Die beiden Mutanten hatten einen Defekt der Cytochromoxidase Untereinheit 1 (ts-4304) bzw. 1 und 2 (ts-852) gezeigt . Die beiden rRNA's fehlen zusammen mit allen übrigen mtRNA's , in den Mutanten ts-297 (Gr.24) und ts-1628 (Gr.135 , nicht gezeigt). Statt dessen sind zwei neue , wahrscheinlich kleinere , RNA-Komponenten im Gel sichtbar . Beide genannten Mutanten waren in den Cytochromoxidase Untereinheiten 1 und 2 defekt gewesen .

Offensichtliches Kennzeichen fast aller in Fig.71 dargestellten RNA-Präparationen ist ein Defekt in der Biosynthese mitochondrieller rRNA , sei es als ganzes oder hinsichtlich einer der beiden rRNA-Arten . Dabei fällt auf , daß unter den 21 S rRNA-Varianten sich keine befindet , welche die ungespleißte Vorstufe dieser RNA zeigt . Die beobachteten Abweichungen vom Wildtyp-Muster bestehen entweder in einer relativen Verringerung der Menge oder in einem vollständigen Verschwinden einer der beiden rRNA-Banden . Da bisher keine Hinweise existieren , daß die rRNA-Spezies von gesonderten RNA-Polymerasen synthetisiert werden , dürfte die Ursache für den spezifischen Defekt einer der beiden wohl eher in einem differentiell beschleunigtem Abbau derselben zu suchen sein . Es erscheint möglich , daß mutationsbedingte Veränderungen in der Zusammensetzung oder Konformation einer Ribosomen-Untereinheit - bedingt etwa durch eine Mutation einer ihrer Protein-Untereinheiten - gelegentlich zu einer erhöhten Nuklease-Empfindlichkeit einer oder beider rRNA's führt .

Allerdings erscheint es auf dem ersten Blick erstaunlich , daß derart einschneidende Veränderungen in dem mitochondriellen Translationsapparat oft nur zum Ausfall von 1-2 Cytochrom-

oxidase Untereinheiten führen, und nicht zum generellen Ende der gesamten mitochondriellen Proteinsynthese. Es muß in weiteren Experimenten geklärt werden, ob sich beide Effekte auch bei gleichzeitiger Überprüfung in ein und derselben Mutantenkultur reproduzieren lassen. Falls der rRNA- und damit der mitochondrielle Proteinsynthese-Defekt nicht vollständig ist, sondern – etwa bedingt durch den ts-Charakter – nur zu einer starken Verringerung der Proteinsyntheseraten führt, könnten Proteine mit gerigen Umsatzraten u.U. bei der Pulsmarkierung in einem solchen System unerfaßt bleiben.

Eine weitere Erklärung, für die es bisher allerdings noch keine sonstigen Anhaltspunkte gibt, bestünde in der Annahme, daß die Synthese der Cytochromoxidase Untereinheit I und, in geringerem Maße, auch II besonders hohe Anforderungen an die Unversehrtheit und Effizienz der mitochondriellen Ribosomen stellt. In diesem Fall wären mutationsbedingte Veränderungen von rRNA oder ribosomaler Proteine u.U. für die Synthese mancher mitochondrieller Polypeptidketten tolerabel, für die anderer jedoch nicht.

Die in Fig.68-71 gezeigten Bandenmuster von Proteinsynthese- bzw. Cytochromoxidase-defekten pet-ts Mutanten bedeuten, soweit sie Wildtyp-ähnlichen Charakter besitzen, daß hier der Defekt nicht im mitochondriellen Transkriptionsapparat generell zu suchen ist. Ob im Einzelfall die Reifung eines Transkriptes nicht oder nur unvollständig erfolgte, kann mit dieser Methodik nicht entschieden werden. Ein vollständiger Ausfall der mitochondriellen RNA-Synthese, wie er in einer ganzen Reihe von Mutanten vorzuliegen schien, muß dann bezweifelt werden, wenn nicht gleichzeitig auch ein Ausfall der mitochondriellen Proteinsynthese als ganzes beobachtet wird. In allen anderen Fällen muß nochmals geprüft werden, ob das scheinbare Fehlen von mtRNA nicht auf experimentelle Unzulänglichkeiten, etwa sehr geringen RNA-Gehalt der Zellen oder der Proben, zurückzuführen ist. Erwartungsgemäß enthielten nur sehr wenige der

Mutanten mit dem Phänotyp eines allgemeinen mitochondriellen Proteinsynthese-Defektes ein Wildtyp-artigen mtRNA-Bandenmuster (z.B. ts-1666 und ts-2610 in Fig.70). Andere Mutanten dieser wie auch der beiden anderen Gruppen enthielten gut ausgeprägte rRNA-Banden vor einem sonst fast leeren Hintergrund. Dies könnte zum einen die längere Halbwertszeit von rRNA im Vergleich zu den meisten mRNA's widerspiegeln. Für den alternativen Schluß, daß verschiedene RNA-Polymerasen für die Synthese von ribosomaler bzw. messenger-RNA verwendet werden, gibt es bisher keine zusätzlichen Hinweise. Da jedoch auf der mtDNA keine einheitlichen Promotor-Sequenzen gefunden wurden, könnte man sich auch eine Mutation von einer der mehreren Promotor-Erkennungsstellen an der RNA-Polymerase vorstellen, die dann zum spezifischen Ausfall der mRNA-Synthese eines einzelnen Genes führen würde.

IV. Diskussion

Die im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten enzymologischen Untersuchungen an pet-ts Mutanten haben gezeigt, daß in 71 % der untersuchten Mutanten gekoppelte Ausfälle zweier oder mehrerer Atmungskettenenzym-Aktivitäten und keine spezifischen Einzeldefekte auftreten. Spezifische Ausfälle wurden lediglich bei der Cytochromoxidase, und zwar in 24 % aller untersuchten Mutanten beobachtet. Grundsätzlich ähnliche Ergebnisse waren – allerdings mit weniger untersuchten Mutanten – mit einem Verhältnis pleiotroper zu spezifisch Oxidase-defekter Mutanten von 56 : 44 % (81) bzw. von 71 : 6 % (82) auch schon früher von anderen Autoren mit nicht-konditionell atmungsdefekten Hefemutanten gefunden worden. Leider hat somit der Übergang auf temperatursensitive Mutanten keine grundlegende Änderung der Situation mit sich gebracht. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Versuche zur sukzessiven Inaktivierung der einzelnen Enzyme in pleiotropen pet-Mutanten bei 36 °C – von U. Wittmann-Hoja war ein solches Verhalten vereinzelt festgestellt worden (36) – konnten einen solchen Inaktivierungsmechanismus nicht als generelle Eigenschaft von pet-ts Mutanten nachweisen. Untersuchungen mit Wildtyp-Hefe haben gezeigt, daß auch hier unter extremen Kulturbedingungen, wie in Laktat-Medium unter Mangelbedingungen, d.h. weit in die stationäre Phase hinein, oder nach Zusatz von Hemmstoffen der mitochondriellen Atmungskette und cytoplasmatischen Proteinsynthese, oder nach Entzug der Kohlenstoffquelle, unspezifische Aktivitätsverluste der Atmungskettenenzyme als Folge dieser Bedingungen auftreten können. In 1 % Galaktose-Medium vor Erreichen der stationären Phase können solche Effekte allerdings hintangehalten werden. Katabolitrepersions-Effekte traten unter diesen Bedingungen ebenfalls noch nicht in nennenswertem Umfang auf. Aus diesen Gründen können die beobachteten, pleiotropen Enzymdefekte sicherlich zu Recht ursäch-

lich mit der Mutation und nicht mit unspezifischen, auf nicht-optimale Kulturbedingungen der Mutanten zurückzuführende Effekte, in Zusammenhang gebracht werden.

Gestützt wurden die hier vorgestellten Ergebnisse des Vorliegens eines spezifischen Cytochromoxidase-Defektes in einer Vielzahl von pet-ts Mutanten auch durch einen anderen, davon unabhängigen experimentellen Ansatz. Michaelis et.al. haben in den von uns bearbeiteten pet-ts Mutanten die mitochondrielle Proteinsynthese bei nicht-permissiver Temperatur untersucht (60). Dabei fanden sie, daß 13% der untersuchten Mutanten einen pleiotropen Ausfall aller mitochondriell synthetisierter Proteine aufwiesen, und daß 28% der untersuchten Mutanten einen spezifischen Defekt einer oder mehrerer mitochondriell kodierter Cytochromoxidase Untereinheiten besaßen. Diese Daten stimmen gut mit den oben erwähnten enzymchemischen Befunden überein. Allerdings konnten beide experimentellen Ansätze die Frage nach dem Warum, einmal der überraschend hohen Zahl spezifischer Cytochromoxidase-Defekte (etwa 50 Komplementationsgruppen), zum anderen der Tatsache, daß ansonsten fast ausschließlich gekoppelte Defekte gefunden wurden, bisher nicht beantworten. Einige Gründe können lediglich diskutiert werden: Zum einen ist es prinzipiell möglich, daß einige der untersuchten Komplementationsgruppen in Wirklichkeit intragene Komplementation darstellen und somit ein und demselben Gen zuzuordnen sind. Eindeutig auszuschließen wäre dies nur durch Kartierung der betreffenden Mutationen in verschiedenen Genloci. Entsprechende Versuche wurden erst in wenigen Fällen gemacht. Eine besonders große Zahl spezifisch Cytochromoxidase defekter Mutanten ist auf der anderen Seite aber auch nicht unwahrscheinlich. Das komplex gebaute Enzym besteht einmal aus einer Reihe (mindestens 4) Kern-kodierter Untereinheiten, die beim Einschleußen in die Mitochondrien auch noch einen post-translationalen Reifungsprozess durchlaufen müssen. Zum anderen müssen die Mitochondrien-kodierten Cytochromoxidase Untereinheiten sowohl post-transkriptionale wie möglicherweise auch post-translationalen Veränderungen erfahren.

wofür zum großen Teil ebenfalls Kern-kodierte Enzyme nötig sind. Zusätzlich weist das OXI 3-Gen die komplizierteste aller bekannten mitochondrialen Mosaik-Strukturen auf. Schließlich dürften spezifische Transportmechanismen von cytoplasmatisch synthetisierten Cytochromoxidase Untereinheiten durch die Mitochondrienmembran ebenfalls von Kern-kodierten Funktionen abhängen.

In gewisser Weise hat es überrascht, daß der einzige in dieser Arbeit gefundene ATPase-Defekt nicht pleiotrop war. Auf Grund einer fehlenden ATP-Synthese hätte eine, zumindest erniedrigte, mitochondrielle Proteinsynthese und damit verbunden ein gesteigerter unspezifischer Abbau von Atmungskettenproteinen vermutet werden können. Dieser Befund wurde hier aber nicht weiter verfolgt, da gerade die Frage nach den Ursachen für die Pleiotropie von pet-ts Mutanten besonders interessant erschien. Zu deren Klärung mußten jedoch anstelle der bisherigen enzymchemischen Versuche ein anderer experimenteller Ansatz gesucht werden. Dieser ergab sich aus den von Michaelis et.al. gefundenen mitochondrialen Proteinsynthesedefekten in bestimmten pet-ts Mutanten. Diese konnten sowohl durch mutationsbedingte Defekte des mitochondrialen Translations- als auch des mitochondrialen Transkriptionsapparates ausgelöst worden sein. Beide Systeme sind in der Mehrzahl ihrer Komponenten Kern-kodiert. Somit sollte eine entsprechende Mutation innerhalb unserer pet-ts Mutanten-Sammlung zu finden sein. Es sollten daher im weiteren Verlauf der Arbeit Untersuchungen zur Unversehrtheit bzw. Schädigung der mtDNA-Transkription in Translationsdefekten pet-ts Mutanten durchgeführt werden.

Als Vorarbeiten dazu war es nötig, eine Restriktionskartierung der mtDNA des Stammes SC 167 durchzuführen: Von diesem Stamm leiteten sich alle unsere Mutanten ab und die zu untersuchenden SC 167 mtDNA-Transkripte sollten mit definierten mtDNA Proben charakterisiert werden. Restriktionskarten von mtDNA's verschiedener S.cerevisiae Stämme waren schon von

anderen Autoren aufgestellt worden (6,83). Dabei war beobachtet worden, daß die relative Anordnung der verschiedenen Gene auf dem Mitochondriengenom zueinander immer erhalten geblieben war. Dies konnte dann auch in dieser Arbeit hinsichtlich der Gene COB, OXI 3 und OXI 2 für den Stamm SC 167 nachgewiesen werden. Allerdings kann man in verschiedenen *S.cerevisiae* Stämmen deutliche Unterschiede hinsichtlich Größe und Restriktionsmustern des Mitochondriellen Genoms feststellen. Ein Vergleich der Stämme SC 167 und KL14-4A, die nach unseren Messungen etwa gleich große mtDNA's besitzen, zeigt, daß beide mtDNA's auf Grund ihrer Restriktionsmuster zu mindestens 70 % homolog sein dürften. Insbesondere gilt dies für die Bereiche des COB- und OXI 3-Gens. Die letztgenannte Tatsache erlaubt es daher, zur Charakterisierung von OXI 3-Transkripten aus SC 167, Hybridisierungsproben aus der besser bekannten und zum Großteil sequenzierten KL14-4A mtDNA zu verwenden. Die Restriktionskarte der SC 167 mtDNA konnte nahezu vollständig erstellt werden. Einige Punkte bedürfen allerdings der Diskussion und eventuellen Überprüfung. So wurde auf die Existenz zweier Hind III-Schnittstellen an den Positionen 84.5 und 85.0 kb aus den Tatsachen geschlossen, daß sich erstens zwischen einem Xba I/Sal I-Fragment (XS 2, 6.9 kb) und dem Xba I/Hind III-Fragment (XD 3, 5.8 kb) eine Lücke von 1.1 kb Länge ergab, und zweitens in einer Eco RI/Hind III-Verdauung keine Veränderung bei zusätzlicher Verdauung mit Sal I festgestellt wurde. Hierbei hätte aber ein zusätzliches Fragment von 1.1 kb Länge auftreten müssen. Da Fragmente mit einer Länge über 0.7 kb in den benutzten Gelsystemen hätten bemerkt werden müssen, wurde geschlossen, daß etwa in der Mitte dieses 1.1 kb Hind III/Sal I-Fragmentes noch eine Hind III-Schnittstelle lokalisiert sein müßte. Ebenfalls in dieser Region ab Position 81.0 kb ist die Reihenfolge der Hinc II-Fragmente HH 9 und HH 12 noch nicht geklärt. Sie wurden in die Karte entsprechend ihrer in KL14-4A ermittelten Anordnung eingetragen. Weiterhin ergab sich an Position 53.1 kb in der Eco RI-Karte eine Lücke von 0.4 kb. An dieser Stelle ist in KL14-4A ein 1.5 kb großes Eco RI-Fragment zu finden. Bei Hybridisierung mit diesem Fragment konnte aber in

SC 167 mtDNA keine Homologie festgestellt werden. Es muß daher im Moment offen bleiben, ob in SC 167 in diesem Bereich kein vergleichbares EcoRI-Fragment auftritt, oder ob die scheinbare Lücke auf Meßfehler zurückzuführen ist. Ebenfalls noch nicht klar ist die Situation an Position 40.1 kb bezüglich der Hinc II-Karte. Ein auf Grund der Restriktionsspaltungen hier festgestelltes 1.0 kb großes Hinc II-Fragment wurde noch nicht durch Hybridisierung geeigneter anderer, Überlappender Restriktionsfragmente bestätigt.

Die Gesamtlänge der SC 167 mtDNA wurde in dieser Arbeit zu 85.5 kb bestimmt. Dies sind 9 kb mehr als der Literaturwert für die Länge der KL14-4A mtDNA. Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, könnte dies auf unterschiedliche Methoden der Größenbestimmung beruhen. Allerdings meinen wir, bei der hier angewendeten Methode besonders verlässliche Werte erhalten zu haben. Um eine Reihe von Problemen bei der Größenbestimmung auszuschalten, wurden in dieser Arbeit Standard-DNA Fragmente zusammen mit der zu analysierenden Probe in derselben Bahn eines Agarosegels elektrophoretisiert. Viele solcher Bahnen wurden dann mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgewertet, dem ein von anderen Autoren (48) verbesserter Ansatz zur Theorie der Größenbestimmung in Agarosegelen zugrunde lag. SC 167 mtDNA gehört damit zu den "langen" Mitochondriengenomen, worauf schon das Ergebnis genetischer Versuche hindeutete, daß SC 167 ein ω^+ -Stamm ist (Michaelis, pers.Mittlg.), der ein optionales 21 S rRNA Insertionselement ω enthält.

Beim Versuch, Restriktionsfragmente aus SC 167 und KL14-4A mtDNA in Plasmidvektoren zu klonieren, war von uns, wie auch schon von anderen Autoren (84) gefunden worden, daß es offenbar nicht möglich ist, sämtliche Bereiche des mtGenoms in Form der entsprechenden EcoRI-, BamHI-, EcoRI/BamHI- und EcoRI/Hind III-Fragmente kloniert zu erhalten. Wie das im Ergebnisteil geschilderte Beispiel der KL14-4A EcoRI/Hind III-Fragmente DR 6 und RD 7 zeigt, kann dies sicher nicht auf experimentelle Unzulänglichkeiten zurückgeführt werden. Einen Hin-

weis auf die Ursache dieser Schwierigkeiten gibt wahrscheinlich der Befund, daß es ganz allgemein nicht möglich ist, DNA-Segmente mit direkten Sequenzwiederholungen stabil in *E. coli* zu klonieren, selbst wenn der Wirtsstamm recA^- ist (75). Es ist bekannt, daß mtDNA derartige, über das gesamte Genom verstreute, "direct repeats" von 10-17 bp Länge aufweist (10, 16). Sie werden für das häufige Auftreten sog. ρ^- Deletions-Mutanten in Hefe-mtDNA verantwortlich gemacht. In künftigen Klonierungsversuchen können diese Schwierigkeiten bei Kenntnis der Restriktionskarte eventuell umgangen werden, indem man zur Klonierung nur sehr kleine Fragmente aus einem Strukturgen-Bereich heranzieht. Trotz allem konnten in dieser Arbeit immerhin 15 Restriktionsfragmente kloniert erhalten werden, von denen dann zwei KL14-4A OXI 3-Klone zum Nachweis von OXI 3-Transkripten in *pet-ts* Mutanten verwendet wurden.

Bei der Untersuchung der Gesamtheit der Transkripte in einzelnen *pet-ts* Mutanten durch Elektrophorese von mRNA mit anschließender EtBr-Färbung wurden fast alle denkbaren RNA-Muster Defekte gefunden. Sowohl die gesamte RNA-Synthese, wie auch spezifisch die rRNA- oder mRNA-Synthesen waren in bestimmten Mutanten betroffen. Bei den rRNA-Defekten fiel auf, daß in keinem Fall eine Vorstufe der rRNA's angehäuft wurde, sondern daß hauptsächlich Veränderungen in den relativen Bandenstärken der beiden rRNA-Arten oder gelegentlich auch der Verlust einer der beiden rRNA's auftraten. In drei Fällen allerdings wurde eine auffällige Verschiebung beider rRNA-Banden zu niedrigerem Molekulargewicht hin gefunden. Ein solcher Defekt, wie auch die zuvor erwähnten, könnte seine Ursache in einer veränderten Proteinkomponente des mitochondriellen Ribosoms haben. Durch eine veränderte Ribosomenstruktur könnten die rRNA's einzeln oder zusammen einem nukleolytischen Angriff – sei er teilweise oder vollständig – zugänglich gemacht werden. Ein allgemeiner RNA-Synthese Defekt tritt zu häufig auf, als daß in allen Fällen Artefakte ausgeschlossen und auf einen RNA-Polymerase Defekt geschlossen werden könnte.

Ein Vergleich der RNA-Synthese Defekte mit den von Michaelis gefundenen mitochondriellen Proteinsynthese Defekten derselben Mutanten ergab, daß allgemeine Proteinsynthese Defekte seltener beobachtet wurden als allgemeine mtRNA- oder rRNA-Synthese Defekte. Daher fallen vorerst die RNA-Synthese Defekte oft mit spezifischen Proteinsynthese Defekten zusammen. Eine Klärung muß in diesen Fällen vielleicht durch eine Wiederholung beider Versuchsreihen unter gleichzeitiger Bestimmung der RNA- und Proteinsyntheseraten herbeigeführt werden. Gelmuster, in denen nur noch rRNA, aber keine nicht-ribosomale RNA mehr nachzuweisen war, könnten vielleicht daher rühren, daß in diesen Mutanten die rRNA durch die ribosomalen Proteine für eine gewisse Zeit vor einem nukleolytischen Abbau geschützt werden kann, aber eigentlich doch ein allgemeiner RNA-Defekt vorliegt. Ein zu geringer Probenauftrag als Ursache für das Fehlen sichtbarer RNA-Banden ist in all den Fällen auszuschließen, in denen die auf den Gelen ebenfalls sichtbare DNA-Bande annähernd dieselbe Stärke aufweist wie im Wildtyp. Diejenigen Proteinsynthese negativen Mutanten schließlich, die noch Wildtyp-artige RNA-Muster zeigen, sind gute Kandidaten für einen Mutations-bedingten Defekt in einem der ribosomalen Proteine.

Schließlich wurden im Rahmen dieser Arbeit noch die OXI 3-Transkript Muster verschiedener pet-ts Mutanten untersucht, die einen Ausfall in der Synthese der Cytochromoxidase Untereinheit I allein, oder zusammen mit Untereinheit II aufwiesen. Unter Verwendung von drei verschiedenen spezifischen OXI 3-DNA Proben konnten so tatsächlich in den Vertretern von 5 Komplementationsgruppen Defekte hinsichtlich der Reifung von OXI 3-Transkripten nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 3 Stoppstellen der Reifung gefunden, die zu 4 verschiedenen Transkriptmustern führten. Mit Hilfe von Mutanten und Wildtyp wurden insgesamt 12-14 Zwischenstufen der Reifung des Oxi 3 Primärtranskriptes registriert. Der Größenbereich erstreckt sich von 2.2 kb (reife mRNA) bis zu 11.2 kb (etwa Genlänge). Längere Transkripte, die auch ein OLI 2-Transkript

auf einer zunächst polycistronischen mRNA enthalten, wie es z.B. von anderen Autoren für einen anderen Hefestamm berichtet wird (77), konnten in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Aus der Tatsache, daß in einer Mutante das größte Transkript mit 11.2 kb allein angehäuft wird, und weder Intron aI_1 noch Intron aI_2 ausgeschnitten nachgewiesen werden konnten, führt zu dem Schluß, daß offenbar in einem sehr frühen Stadium der Reifung ein Kern-kodiertes Protein benötigt wird, und daß bei seiner Schädigung alle anderen, u.a. auch die mitochondriell kodierten Reifungsprozesse, nicht ablaufen können. Dies steht in gewissem Gegensatz zu Beobachtungen an mit^- -Mutanten, die auf eine frühe Beteiligung mitochondriell kodierter Funktionen hindeuteten (85). Entweder liegt also der erwähnte Kern-kodierte Schritt noch vor diesen mitochondriell kodierten, oder für diese ersten Schritte ist ein Multienzymkomplex nötig, der sowohl aus Kern- als auch aus Mitochondrien-kodierten Untereinheiten besteht. Ein zweiter Block in der Reifung wurde bei einer Transkriptlänge von ca. 8.3 kb beobachtet. Dieser Block gab Anlaß zu mindestens zwei verschiedenen Transkriptmustern und wurde von Mutanten aus drei Komplementationsgruppen verursacht. U.U. können daher auf dem Weg zwischen dem 11.2 kb und dem 8.3 kb Transkript 2-3 alternative Spleißwege eingeschlagen werden. Schließlich wurde auch noch gefunden, daß offenbar auch für einen relativ späten Reifungsschritt ein Kern-kodiertes Enzym nötig ist. Sein Ausfall führt zum Anhäufen eines 3.2 kb Transkriptes. Da die reife OXI 3-mRNA ca. 2.2 kb lang ist, kann man schließen, daß aus dem 3.2 kb großen Zwischenprodukt die beiden großen Introns aI_1 und aI_2 (2.4 bzw. 2.5 kb) bereits herausgespleißt wurden. Eine kürzere Zwischenstufe wurde weder in dieser, noch in anderen (16,77) Arbeiten beobachtet, sodaß u.U. als letzter Prozessierungsschritt das Herausschneiden eines 1 kb langen Introns, vielleicht Intron aI_{11b} , aI_3 oder aI_4 , erfolgt.

Um die Reihenfolge und Art der Spleiß- und Trimm-Reaktionen im Verlauf der OXI 3-Transkriptreifung genau aufzuklären, sollten künftige Untersuchungen mit mehr und feiner abgestuften

DNA-Proben durchgeführt und , wenn möglich , auch noch durch Pulsmarkierungsexperimente ergänzt werden , durch die bei temperatursensitiven Mutanten mögliche Störeffekte aus restlicher Wildtyp-RNA ausgeschaltet werden können .

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden enzymologische und molekularbiologische Untersuchungen an temperatursensitiven nuklearen *pet*-Mutationen in der Hefe *S.cerevisiae* durchgeführt. Sie hatten das Ziel, Komplementationsgruppen-spezifische Defekte in den einzelnen Mutanten zu charakterisieren. Es wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

1. 183 Mutanten aus 180 verschiedenen Komplementationsgruppen wurden nach Anzucht unter nicht-permissiven Bedingungen hinsichtlich mutationsbedingter Inaktivierung der Enzyme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung untersucht. Es wurde gefunden, daß spezifische Einzeldefekte der Cytochromoxidase in 47 Komplementationsgruppen auftraten. Für andere Enzyme wurde nur noch ein einziger spezifischer Einzeldefekt und zwar bezüglich der ATPase-Aktivität, in 1 Komplementationsgruppe (Nr. 209b) gefunden. Ein pleiotroper Ausfall aller Atmungskettenenzym-Aktivitäten wurde bei den Vertretern von 22 Komplementationsgruppen beobachtet. Alle anderen untersuchten Mutanten wiesen Doppel- oder Mehrfach-Defekte auf. Dabei fiel auf, daß von dem Ausfall in den meisten Fällen die gesamte Elektronentransportkette betroffen war.
2. Es wurden mit ausgewählten Mutanten Inaktivierungskinetiken der Enzyme der mitochondriellen oxidativen Phosphorylierungskette bei nicht-permissiver Temperatur aufgenommen. Hierbei wurde festgestellt, daß diese Methode keine grundlegend anderen Ergebnisse liefert, als wenn die Enzymaktivitäten zu einem einzigen, vorher optimierten Zeitpunkt nach der Überführung auf nicht-permissive Temperatur gemessen werden.
3. Mit *S.cerevisiae* Wildtyp-Kulturen wurden die Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung bei 36 °C in Abhängigkeit von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle kinetisch verfolgt. Es wurde gefunden, daß sich hinsichtlich Aufrechterhaltung und Höhe der Enzymaktivitäten, Atmungsraten und Wachstumsraten Galaktose am besten als Kohlenstoffquelle für die *pet-ts* Mutanten eignet.
4. Mit *S.cerevisiae* Wildtyp und zwei Proteinase A- bzw. B-defekten Mutanten wurden in Laktat-Medium mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung sowie der cytoplasmatischen Proteinsynthese, mutationsbedingte Schädigungen simuliert und deren Einfluß auf die Aktivitäten aller anderen untersuchten Enzyme betrachtet. Dabei wurde gefunden, daß unter diesen Bedingungen der Verlust der Cytochromoxidase- und ATPase-Aktivität oder die Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese zu einem allgemeinen Abbau aller Atmungskettenenzyme beim Wildtyp führt. Qualitativ ähnliche Ergebnisse wurden mit zwei Proteinase A- bzw. B-defekten Mutanten erhalten. Daraus geht hervor, daß dieser Enzym-Abbau unabhängig von diesen beiden Proteasen in der Zelle abläuft.
5. Vom mitochondriellen Genom des Hefestammes SC167 wurde unter Verwendung von 9 verschiedenen Restriktionsendonukleasen eine detaillierte Restriktionskarte erstellt. Ein Vergleich dieser Karte mit der des von anderen Laboratorien häufig benutzten Stammes K14-4A ergab, daß in den etwa 70%

des Genoms umfassenden Bereichen der Gene für die 21S rRNA, für Apocytochrom b und für die Cytochromoxidase Untereinheit I große Ähnlichkeiten vorhanden sind. Unterschiede ergaben sich im Bereich der Gene OXI 1 und OXI 2, wo ein 9.4 kb EcoRI-Fragment in KL14-4A durch ein ca. 1 kb EcoRI-Fragment in SC167 ersetzt ist. Weiterhin fehlen in diesem Bereich bei SC167 zwei Hind III-Schnittstellen gegenüber KL14-4A mtDNA. Darüberhinaus konnte durch Hybridisierung eine DNA-Sequenz aus KL14-4A, die laut Genkarte den Karboxyterminalen Teil des OXI 2-Gens beinhalten sollte, in SC167 nicht gefunden werden. Die Größe der SC167 mtDNA wurde auf Grund der Restriktionsdaten zu 85 kb, die der KL14-4A mtDNA zu ca. 86 kb bestimmt. Damit gehören beide Hefestämme zu solchen mit sog. "langem" mitochondrialen Genom. Die von anderen Autoren zu ca. 76 kb bestimmte Größe der mtDNA des Stammes KL14-4A scheint nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen eher unterschätzt.

6. Es wurden insgesamt 7 verschiedene Restriktionsfragmente der SC167 mtDNA und 8 der KL14-4A mtDNA in den Plasmid-Vektor PBR 325 kloniert. Die Größe der Fragmente lag zwischen 1 und 4 kb. Insgesamt umfassen sie 23% der gesamten mtDNA. In diesem Zusammenhang wurde gefunden, daß die Klonierung eines Großteils der EcoRI-, Bam HI-, Hind III- sowie der gemischten EcoRI/Bam HI- und Eco RI/Hind III-Fragmente offensichtlich auf größe-sätzliche Schwierigkeiten stößt. Die Ursache hierfür wurde diskutiert.
7. Es wurden nach 12-14 stündiger Kultivation bei nicht-permissiver Temperatur die mitochondrialen RNA's aus 100 verschiedenen pet-ts Mutanten isoliert. Davon wurden die mRNA's von 84 Mutanten durch Harnstoff/Agarose Gelelektrophorese mit anschließender EtBr-Anfärbung charakterisiert. Die untersuchten Mutanten waren nachweislich in der Biosynthese mindestens eines mitochondrial kodierten Proteins defekt (vgl. Michaelis et.al. 60). Ein Vergleich der erhaltenen Gelmuster mit dem entsprechenden Muster von Wildtyp-mtRNA ergab:
keine Abweichung vom Wildtypmuster in 44 von 84 untersuchten Mutanten,
Mutanten ohne erkennbare RNA-Banden in 14 Fällen,
Mutanten in denen nur die beiden prominenten rRNA-Banden sichtbar sind, in 12 Fällen,
in 14 Fällen wurde ein vom Wildtyp abweichendes rRNA-Muster beobachtet, wie z.B. Fehlen bzw. Schwächung von entweder 15S rRNA oder 21S rRNA oder Ausfall beider und statt dessen Auftreten zweier neuer Komponenten mit niedrigerem Molekulargewicht.
8. Es wurden nach 12-14 stündiger Kultivation bei nicht-permissiver Temperatur die OXI 3-Transkripte von 65 verschiedenen pet-ts Mutanten untersucht, welche nachweislich (vgl. Michaelis et.al. 60) entweder spezifisch die mitochondrial synthetisierte Cytochromoxidase Untereinheit I (OXI 3 kodiert) oder zusätzlich auch noch die Cytochromoxidase Untereinheit II (OXI 1 kodiert) nicht mehr enthielten. "Northern-blot"-Hybridisierungen mit drei verschiedenen OXI 3 DNA-Proben ergaben, daß mindestens vier Kern-kodierte Enzyme, verteilt auf fünf verschiedene Komplementationsgruppen, zur Reifung der OXI 3-Transkripte benötigt werden. Demnach bedürfen zwei bis drei frühe und ein später Schritt der OXI 3 mRNA-Reifung eines Kern-kodierten Enzyms. Weiterhin sind diese ersten Schritte offenbar eine Voraussetzung dafür, daß alle weiteren Prozessierungsreaktionen ablaufen können.

VI. Literaturverzeichnis

- (1) A.Tzagoloff, G.Macino und W.Se bald, Ann.Rev.Biochem. 48, 419 (1979).
- (2) J.Suyama und K.Miura, Proc.Natl.Acad.Sci. 60 , 235 (1968).
- (3) P.L.Altman und D.D.Katz (eds.), Biological Handbooks I, Cell Biology, S.217 , Fed.Am.Soc.Exp.Biol., Bethesda (1976).
- (4) B.L.Ward, R.S.Anderson und A.J.Bendich , Cell 25 , 743 (1981).
- (5) S.Anderson, A.T.Bankier, B.G.Barrel, A.H.L.de Bruijn, A.R.coulson, J.Drouin, I.C.Eperon, D.P.Nierlich, B.A.Roe, F.Sanger, P.H.Schreier, A.J.A.Smith, R.Staden und I.G.Young, Nature 290 , 457 (1981).
- (6) J.P.M.Sanders, Ch.Heiting, M.P.Verbeet, F.C.P.W.Meijlink und P.Borst, Molec.gen.Genet. 157 , 239 (1977).
- (7) M.Douglas und R.A.Butow , Proc.Natl.Acad.Sci. 73 , 1083 (1976).
- (8) L.A.Grivell, Spektrum d. Wissensch. 5 , 72 (1983).
- (9) C.Gaillard und G.Bernardi , Mol.gen.Genet. 174 , 335 (1979).
- (10) M.de Zamaroczy, G.Faugeron-Fonty und G.Bernardi , Gene 21 , 193 (1983).
- (11) B.Dujon, A.M.Colson und P.P.Slonimski in "Mitochondria 77" (eds.W.Bandlow, R.J.Schweyen, K.Wolf und F.Kaudewitz) S. 579 , Walter de Gruyter , Berlin (1977).
- (12) B.Dujon , Cell 20 , 185 (1980).
- (13) J.Lazowska, C.Jacq und P.P.Slonimski , Cell 22 , 333 (1980).
- (14) A.Tzagoloff, M.Nobrega, A.Akai und G.Macino , Curr.Genet 2 , 149 (1980).

- (15) S.Bonitz und A.Tzagoloff , J.Biol.Chem. 255 , 9075 (1980).
- (16) F.G.Nobrega und A.Tzagoloff , J.Biol.Chem. 255 , 9828 (1980).
- (17) S.Bonitz,G.Coruzzi,B.E.Thalenfeld und A.Tzagoloff , J. Biol.Chem. 255 , 11927 (1980).
- (18) P.Netter,G.Carignam,C.Jacq,O.Groudinski,L.Chavilier und P.P.Slonimski , Mol.Gen.Genet. 188 , 51 (1982).
- (19) J.L.Bos.C.Heyting,P.Borst,A.C.Arnberg,E.F.J.van Bruggen Nature 275 , 336 (1978).
- (20) A.Lamoureux,P.Pajot,A.Kochko,A.Halbreich und P.P. Slonimski , in "The organization and expression of the mitochondrial genome" (eds. A.M.Kroon und C.Saccone) , S. 153 , Elsevier/North-Holland Biomedical Press , Amsterdam (1980).
- (21) C.Jacq,P.Pajot,J.Lazowska,G.Dujardin,M.Claissse,O.Groudinski,H.de la Salle,C.Grandchamp,M.Labouesse,A.Gargouri,B.Guiard,A.Spyridakis,M.Dreyfus und P.P.Slonimski , in "Mitochondrial Genes" (eds.P.P.Slonimski,P. Borst und G.Attardi) , S. 155 , Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor (1982).
- (22) P.Borst und L.A.Grivell , Nature 289 , 439 (1981).
- (23) W.Neupert und G.Schatz,TIBS 1 , 1 (1981).
- (24) R.Zimmermann,U.Paluch und W.Neupert , FEBS Letters 108 , 141 (1979).
- (25) E.M.Neher,M.A.Harmey,B.Hennig,R.Zimmermann und W.Neupert , in "The organization and expression of the mitochondrial genome" (eds. A.M.Kroon und C.Saccone) , S. 413 , Elsevier/North-Holland Biomedical Press , Amsterdam (1980).
- (26) G.Burkl,W.Demmer,U.Holzner und E.Schweizer in "Genetics , biogenesis and bioenergetics of mitochondria" , S. 39 , Walter de Gruyter ; Berlin (1976).

- (27) P.P.Slonimski, P.Pajot, C.Jacq, M.Foucher, G.Perrodin, M.Kochko und A.Lamoureux in "Biochemistry and genetics of Yeast" (eds. M.Bacida, B.L.Horecker und A.O.M.Stoppa-ni), S.339 , Academic Press , New York (1978).
- (28) Konstruiert aus HB 101 von R.L.Rodriguez , vgl. R.L.Rodriguez, F.Bolivar, H.M.Goodman, H.W.Boyer und M.C. Betlach in "Molecular mechanisms in the control of gene expression (eds. D.P.Nierlich, W.J.Rutter und C.F. Fox), S. 471 , Academic Press , New York (1976).
- (29) M.Schweizer, M.E.Chase, C.C.Dykstra, N.H.Giles und S.R. Kushner , Proc.Natl.Acad.Sci.78 , 5086 (1981).
- (30) J.Messing, R.Crea und P.H.Seeburg , Nucl.Acids Res. 9 , 309 (1981).
- (31) F.Bolivar , Gene 4 , 121 (1978).
- (32) L.Covarrubias und F.Bolivar , Gene 17 , 79 (1982).
- (33) U.Rüther, M.Koenen, K.Otto und B.Hill , Nucl.Acids Res. 9 , 4087 (1981).
- (34) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.J.Rand , J.Biol. Chem. 193 , 265 (1951).
- (35) J.Naggert , "Untersuchungen zur Biosynthese der mito-chondriellen Atmungskette in Hefe" , Diplomarbeit , Uni-versität Erlangen-Nürnberg (1980).
- (36) U.Wittmann , "Untersuchungen zur Biosynthese der mito-chondriellen Atmungskette in Hefe mit Hilfe atmungs-defekter Mutanten" , Diplomarbeit , Universität Erlang-en-Nürnberg (1982).
- (37) T.L.Mason, P.O.Poyton, D.C.Wharton und G.Schatz , J.Biol. Chem. 248 , 1346 (1973).
- (38) G.Palmer in "Methods in Enzymology Vol. LIII" , S. 113 , Academic Press , New York (1978).
- (39) M.B.Katan, L.Pool und G.S.P.Groot , Eur.J.Biochem. 65 , 95 (1976).
- (40) U.K.Laemmli , Nature 227 , 680 (1970).

- (41) R.T.M.J.Vaessen, J.Kreike und G.S.P.Groot , FEBS Lett. 124 , 193 (1981).
- (42) F.C.Greenwood, W.M.Hunter und J.S.Glover , Biochem.J. 89 , 114 (1963).
- (43) B.Lang, G.Burger, I.Doxiadis, D.Y.Thomas, W.Bandlow und F.Kaudewitz , Anal.Biochem. 77 , 110 (1977).
- (44) M.E.S.Hudspeth, D.S.Shumard, K.M.Tatti und L.I.Grossmann , Biochim.biophys.Acta 610 , 221 (1980).
- (45) G.-J.B. van Ommen, G.S.P.Groot und L.A.Grivell , Cell 18 , 511 (1979).
- (46) D.S.Holmes und M.Quigley , Anal.Biochem. 114 , 193 (1981).
- (47) H.C.Birnboim und Y.Doly , Nucl.Acids Res. 7 , 1513 (1979).
- (48) H.E.Schaffer und R.R.Sederoff , Anal.Biochem. 115 , 113 (1981).
- (49) R.Hayward in "Gel electrophoresis of nucleic acids" (eds. D.Rickwood und B.D.Hames), S.229 , IRL Press Ltd., Oxford (1982).
- (50) E.M.Southern , J.Mol:Biol. 98 , 503 (1975).
- (51) G.E.Smith und M.D.Summer , Anal.Biochem. 109 , 123 (1980).
- (52) H.P.Zassenhaus, R.A.Butow und Y.P.Hannon , Anal.Biochem. 125 , 125 (1982).
- (53) S.R.Kushner und D.Vapnek in "Media and methods for bacterial genetics", S. 40 , Dep.Biochemistry and Microbiology , University of Georgia , Athens (1980).
- (54) J.Locker , Anal.Biochem. 98 , 358 (1979).
- (55) R.Rott und N.Nelson , J.Biol.Chem. 256 , 9224 (1981).
- (56) B.Ludwig in "Interaction between iron and protein in oxygen and electron transport" (eds. C.Ho und W.C. Eaton), S.153 , Elsevier , New York (1981).
- (57) M.Brunori und M.T.Wilson , TIBS 7 , 295 (1982).
- (58) R.O.Poyton und E.McKemmie , J.Biol.Chem. 254 , 6763 (1979).

- (59) A.S.Lewin, I.Gregor, T.L.Mason, N.Nelson und G.Schatz ,
Proc.Natl.Acad.Sci. 77 , 3998 (1980).
- (60) G.Michaelis, G.Mannhaupt, E.Pratje, E.Fischer, J.Naggert
und E.Schweizer in "Mitochondrial genes" (eds. P.P.
Slonimski, P.Borst und G.Attardi), S.311 , Cold Spring
Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor (1982).
- (61) P.Borst und L.A.Grivell , Nature 290 , 443 (1981).
- (62) K.Wolf, B.Lang, L.D.Giudice, P.Q.Anziano und P.S.Perlman
in "Mitochondrial genes" (eds. P.P.Slonimski, P.Borst
und G.Attardi), S.355 , Cold Spring Harbor Laboratory
Press , Cold Spring Harbor (1982).
- (63) G.D.Clark-Walker, C.R.Mc Arthur und D.J.Daley , Curr.
Genet. 4 , 7 (1981).
- (64) L.A.Grivell, A.C.Arnberg, L.A.M.Hensgens, E.Roosendaal,
G.J.B. Van Ommen und E.F.J. Van Bruggen in "The organi-
zation and expression of the mitochondrial genome"
(eds. A.M.Kroon und C.Saccone), S.37 , Elsevier/North-
Holland Biomedical Press , Amsterdam (1980).
- (65) C.A.Specht, C.C.DiRusso, C.P.Noctuy und R.C.Ullrich ,
Anal.Biochem. 119 , 158 (1982).
- (66) D.J.Cumming, L.Belcour und C.Grandchamp , Molec.gen.
Genet. 171 , 229 (1979).
- (67) J.P.M.Sanders und P.Borst , Molec.gen.Genet. 157 , 263
(1977).
- (68) J.Locker, M.Rabinowitz und G.S.Getz , J.Mol.Biol. 88 ,
489 (1974).
- (69) R.Morimoto, A.Lewin und M.Rabinowitz , Nucl.Acids Res.
7 , 2331 (1977).
- (70) B.Dujon in "The molecular biology of the Yeast Sacch-
aromyces, life cycle and inheritance" (ed. J.A.Strathern),
S. 505 , Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold
Spring Harbor (1981).
- (71) B.Ephrussi, H.Hottinguer und A.-M.Chimenes , Ann.Inst.
Pasteur 76 , 351 (1949).

- (72) G.Faugeron-Fonty, F.Culard, G.Baldacci, R.Goursot, A. Prunell und G.Bernardi, *J.Mol. Biol.* 134 , 493 (1979).
- (73) J.B.Deutsch, P.Dujon, P.Netter, E.Pedroduilo, P.P.Slonimski, M.Bōlotin-Fukuhara und C.Coen, *Genetics* 76 , 195 (1974).
- (74) A.Lewin, R.Morimoto, M.Rabinowitz und H.Fukuhara, *Mol. gen. Genet.* , 163 , 257 (1978).
- (75) J.Collins, G.Volckaert und P.Nevers, *Gene* 19 , 139 (1982).
- (76) J.Locker, *Anal. Biochem.* 98 , 358 (1979).
- (77) G.Faye und M.Simon, *Cell* 32 , 77 (1983).
- (78) D.Ojala, J.Montoya und G.Attardi, *Nature* 290 , 470 (1981).
- (79) D.Levens, T.Christianson, J.Edwards, A.Lustig, B.Ticho, J.Locker und M.Rabinowitz, in "Mitochondrial genes" (eds. P.P.Slonimski, P.Borst und G.Attardi), S.295 , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1982).
- (80) K.Kruger, P.J.Grabowski, A.J.Zaug, J.Sands, D.E.Gottschling und T.R.Cech, *Cell* 31 , 147 (1982).
- (81) E.Ebner, L.Mennucci und G.Schatz, *J.Biol.Chem.* 248 , 5360 (1973).
- (82) A.Tzagoloff, A.Akai und R.Needleman, *J.Biol.Chem.* 250 , 8228 (1975).
- (83) R.Morimoto und M.Rabinowitz, *Mol.gen.Genet.* 170 , 11 (1979).
- (84) P.E.Berg, A.Lewin, T.Christianson und M.Rabinowitz, *Nucl.Acids Res.* 6 , 2133 (1979).
- (85) L.A.Grivell, L.A.M.Hensgens, K.A.Osinga, H.F.Tabak, P.H. Boer, J.B.A.Crusius, J.C.van der Laan, M. deHaan, G. van der Horst, R.F.Evers und A.C.Arnberg in "Mitochondrial genes" (eds. P.P.Slonimski, P.Borst und G.Attardi), S. 225, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1982).

- (86) B.Seed , in "Genetic engineering" (eds. J.K.Setlow und A.Hollaender), Vol.4 , S. 91 ,Plenum Press,New York (1982).
- (87) M.Grunstein und D.Hogness,Proc.Natl.Acad.Sci. 72 , 3961 (1975).
- (88) E.S.Polakis,W.Bartley und G.A.Meek,Biochem.J. 97 ,298 (1965).
- (89) S.L.Berger und C.S.Birkenmeier , Biochemistry 18 , 5143 (1979).

Lebenslauf

Am 7. September 1951 wurde ich in Fürth/Bay. geboren. Meine Eltern sind Heinz Naggert und seine Frau Anna, geb. Iberl.

- | | |
|--------------|--|
| 1956 - 1962 | Besuch der Grundschule in Wendelstein |
| 1962 - 1971 | Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Martin-Behaim-Gymnasiums in Nürnberg |
| 1971 | Abitur |
| 1971 - 1972 | Ein Semester Studium der Physik an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen |
| 1972 - 1979 | Studium der Chemie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen |
| Juli 1979 | Diplom-Chemiker-Hauptprüfung |
| Sept. 1979 - | Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer |
| Okt. 1980 | |
| Nov. 1980 - | Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer |
| Aug. 1983 | |

